



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

ECO-EPIDEMIOLOGÍA DE LOS CICLOS DE TRANSMISIÓN DE *TRYPANOSOMA*
CRUZI EN EL NOROESTE DE ARGENTINA

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Ciencias Biológicas.

MARTA VICTORIA CARDINAL

Directores de Tesis: Dr. Ricardo E. Gürtler

Dr. Alejandro G. Schijman

Consejero de estudios: Dr. Ricardo E. Gürtler

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Eco-epidemiología

Buenos Aires, noviembre de 2008

RESUMEN

“Eco-epidemiología de los ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el noroeste de Argentina.”

Con el fin de comprender cuál es la estructura de los ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en comunidades rurales de Santiago del Estero, se realizaron los siguientes estudios: a) **Estudio prospectivo de los efectos de la vigilancia vectorial sostenida luego de un rociado comunitario con insecticidas sobre la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros y gatos.** Utilizando los perros domésticos como centinelas de la transmisión, se determinó el impacto a largo plazo de rociados selectivos realizados por la comunidad luego de un rociado masivo con insecticidas piretroides sobre la transmisión de *T. cruzi* en comunidades bajo vigilancia entomológica entre 1992 y 2002. En los años 2000 y 2002 se registraron leves infestaciones por *Triatoma infestans* y se examinaron serológicamente o por xenodiagnóstico 523 perros y gatos. La prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros disminuyó desde 65% en el estudio de base a 8,9% y 4,7% a los 7,5 y 10 años del comienzo de la vigilancia vectorial sostenida, respectivamente. La fuerza anual promedio de infección cayó 260 veces, de 72,7 por cada 100 perros-años en el estudio de base a <0,3% en 2002. La sostenida declinación de la infección por *T. cruzi* en perros y gatos fue el resultado de los rociados selectivos con insecticidas realizados por la comunidad que mantuvieron la abundancia de *T. infestans* infectados a niveles marginales, una alta tasa de reemplazo poblacional de los hospedadores y una baja tasa de inmigración de áreas con transmisión activa.

b) **Impacto del control vectorial comunitario sobre la infestación doméstica y la infección por *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans*, perros y gatos en el Chaco Argentino.** Se determinó el impacto relativo de dos estrategias de control vectorial basadas en la participación comunitaria en dos áreas rurales vecinas abarcando 40 pequeños poblados y 323 viviendas. La prevalencia y abundancia de infestación doméstica fue 1,5 y 6,5 veces mayor, respectivamente, en el área bajo acciones de control por pulsos, no supervisadas, operando bajo los lineamientos del Programa Nacional de Control de Vectores (PNCV) que en el área bajo vigilancia vectorial sostenida y supervisada llevada a cabo conjuntamente por nuestro grupo de investigación y el PNCV. En ambas áreas se detectó una elevada agregación de los hospedadores infectados al nivel de la vivienda. En el área bajo control por pulsos, la prevalencia de infección en vinchucas, perros y gatos fue de 2 a 3 veces mayor que en el área bajo vigilancia sostenida, la mayoría de los animales infectados calificaban como casos

autóctonos y se observó evidencia de transmisión vectorial activa reciente.

c) Uso de un dispositivo inmunocromatográfico para la detección rápida de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en sueros de perros.

Se evaluó un dispositivo inmunocromatográfico para la detección de infección por *T. cruzi* en muestras de sueros caninos provenientes de áreas endémicas y no endémicas para la enfermedad de Chagas. El dispositivo tuvo una especificidad de al menos 94% y una sensibilidad de al menos 96%. En consecuencia, resulta promisorio para el tamizaje de sueros en la vigilancia de la enfermedad o en los programas de intervención.

d) Epidemiología molecular de la infección silvestre y doméstica por *Trypanosoma cruzi* en el Noroeste de Argentina.

Se obtuvieron 99 aislados de *T. cruzi* de las áreas de estudio. A partir de ellos se determinó y analizó la distribución de linajes de *T. cruzi* (identificados mediante estrategias de PCR) en *T. infestans*, perros y gatos domésticos, humanos y mamíferos silvestres. El linaje *T. cruzi* IIe predominó en los hábitats domésticos, hallándose en el 87% de los 54 aislados de *T. infestans*, en el 82% de los 33 aislados de perros y en los 4 gatos hallados infectados. El linaje I predominó entre los 6 aislados obtenidos de mamíferos silvestres. Los ciclos domésticos y silvestres se solapaban en el área de estudio a fines de los 1980s, cuando ocurría intensa transmisión doméstica, y aún se solapan marginalmente en el presente. La introducción de *T. cruzi* desde los hábitats silvestres a los domésticos ocurriría muy raramente en el actual contexto epidemiológico local. La distribución por vivienda de los linajes de *T. cruzi* muestra que las vinchucas, perros y gatos de una determinada vivienda comparten el mismo linaje parasitario en la mayoría de los casos.

Los resultados obtenidos refuerzan el rol de los perros y gatos como principales reservorios domésticos del parásito y demuestran que, para áreas de alto riesgo como las comunidades rurales del noroeste argentino, es necesaria la implementación de una vigilancia vectorial sostenida y supervisada para lograr una efectiva disminución de la transmisión doméstica de *T. cruzi*.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Chagas, *Triatoma infestans*, perros, gatos, centinelas, epidemiología molecular, control vectorial, reservorios, transmisión vectorial, serología, Santiago del Estero.

SUMMARY

“Eco-epidemiology of *Trypanosoma cruzi* transmission cycles in Northwestern Argentina.”

With the aim of understanding the structure of *Trypanosoma cruzi* transmission cycles in rural communities of Santiago del Estero Province, we performed the following studies: a) **A prospective study of the effects of sustained vector surveillance following community-wide insecticide application on *Trypanosoma cruzi* infection of dogs and cats.** Domestic dogs were used as natural sentinels to assess the long-term impact of selective, community-based spraying with pyrethroid insecticides following community-wide spraying on transmission of *Trypanosoma cruzi* in rural villages under surveillance between 1992 and 2002. In 2000 and 2002 light infestations by *Triatoma infestans* were recorded, and 523 dogs and cats were examined serologically or by xenodiagnosis. The prevalence of *T. cruzi* infection in dogs decreased from 65% at baseline to 8.9% and 4.7% at 7.5 and 10 years after sustained vector surveillance, respectively. The average annual force of infection dropped 260-fold from 72.7 per 100 dog-years at baseline to <0.3% in 2002. The sustained decline in *T. cruzi* infections in dogs and cats was the result of selective, community-based insecticide spraying that kept the abundance of infected *T. infestans* at marginal levels, fast host population turnover, and low immigration rates from areas with active transmission.

b) **Impact of community-based vector control on house infestation and *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans*, dogs and cats in the Argentine Chaco.** The relative impact of two community-based vector control strategies was assessed in two neighboring rural areas comprising 40 small villages and 323 houses in one of the regions most endemic for Chagas disease in northern Argentina. The prevalence and abundance of domestic infestation were 1.5- and 6.5-fold higher, respectively, in the area under pulsed, non-supervised control actions operating under the guidelines of the National Vector Control Program (NCVP) than in the area under sustained, supervised surveillance carried out jointly by the UBA research team and NCVP. *T. cruzi* infection was highly aggregated at the household level in both areas. In the pulsed control area, the prevalence of infection in bugs, dogs and cats was two- to three-fold higher than in the area under sustained surveillance, most of the infected animals qualified as autochthonous cases, and evidence of recent vector-borne transmission was observed.

c) **Use of an Immunochromatographic Dipstick Test for Rapid Detection of *Trypanosoma cruzi* in Sera from Animal Reservoir Hosts**

We evaluated an immunochromatographic dipstick test to detect *Trypanosoma cruzi* infection in canine serum samples from areas of endemicity and nonendemicity for Chagas' disease. The dipstick test had a specificity of at least 94% and a sensitivity of at least 96%. Consequently, the dipstick results are promising for serum screening purposes in disease surveillance or intervention programs.

d) Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural Northwestern Argentina. *T. cruzi* isolates were obtained from 99 infected hosts and vectors and were used to assess the distribution of *T. cruzi* lineages (identified by PCR strategies) in *Triatoma infestans*, domestic dogs, cats, humans and sylvatic mammals. *T. cruzi* lineage IIc predominated in domestic habitats; it was found in 87% of 54 isolates from *T. infestans*, in 82% of 33 isolates from dogs, and in the four cats found infected. Domestic and sylvatic cycles overlapped in the study area in the late 1980s, when intense domestic transmission occurred, and still overlap at present though marginally. The introduction of *T. cruzi* from sylvatic into domestic habitats would occur very rarely in the current epidemiological context. The household distribution of *T. cruzi* lineages showed that bugs, dogs and cats from a given house compound shared the same parasite lineage in most cases.

Based on molecular evidence, this result lends further support to the importance of dogs and cats as domestic reservoir hosts of *T. cruzi*. In Argentina, this is the first time that lineage IIc has been isolated from naturally infected domestic dogs and *T. infestans*.

Our results reinforce the role of domestic dogs and cats as major domestic reservoirs of *T. cruzi* and show that sustained, supervised vector surveillance is crucial for effectively controlling *T. cruzi* domestic transmission in rural Northwestern Argentina.

KEYWORDS: Chagas disease, *Triatoma infestans*, dogs, cats, sentinels, lineage, molecular epidemiology, vector control, reservoirs, vectorial transmission, serology, Santiago del Estero.

Publicaciones originadas de la tesis

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral han dado origen a las siguientes publicaciones científicas:

- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Levin JM, Kitron U, Gürtler RE y Schijman AG, 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural Northwestern Argentina. *Int J Parasitol* 38:1533-1543.
- Cardinal MV, Lauricella MA, Marcet PL, Orozco MM, Kitron U, Gürtler RE, 2007. Impact of community-based vector control on house infestation and *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans*, dogs and cats in the Argentine Chaco. *Acta Tropica* 103: 201-211.
- Cardinal MV, Reithinger R, Gürtler RE, 2006. Rapid detection of *Trypanosoma cruzi* in serum from animal reservoir hosts using an immunochromatographic dipstick test. *J Clinical Microb.* 44: 3005–3007.
- Cardinal MV, Castañera MB, Lauricella MA, Cecere MC, Ceballos LA, Vazquez-Prokopec GM, Kitron U, Gürtler RE, 2006. A prospective study of the effects of sustained vector surveillance following community-wide insecticide application on *Trypanosoma cruzi* infection of dogs and cats in rural northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 75: 753-761.

A mi familia

A la memoria de Cuni

AGRADECIMIENTOS

Obtener el título de Doctora en Ciencias Biológicas es hoy el resultado de un camino transitado, que empezó como un sueño en el 2000 y que encontró un lugar donde hacerse realidad en el Laboratorio de Eco-Epidemiología. Este camino ha sido transitado gracias a la compañía y el aliento de muchas personas. He llegado a hacerlo realidad gracias a la dirección del Dr. Ricardo Gürtler quien ha podido encausar mis ganas de crecer y aprender, y a la paciencia y enseñanzas del Dr. Alejandro Schijman, quien tuvo el desafío de tomar una ecóloga y rumbearla por los caminos de la biología molecular.

En este caminar...

...tuve un hada madrina, la Dra Marta Lauricella (Inst. Nac. de Parasitología “Dr Mario Fatała Chabén”-ANLIS) quien entre muchas otras cosas, me inició en el arte de aislar y cultivar *T. cruzi*.

...compartí momentos maravillosos, aprendí mucho y crecí con todos los integrantes del Laboratorio (Ricardo, Leo C, Carla, Gonza, Juan, Judy, Romi, Paula M., Leíto, Marcela, Lucía, Román, Gus A, Jime, Gus E., Sol, Paulita, Julián, Silvana, Emilia, Marina, Fer, Fran y Laura P.).

...Tato Vezzani, Aníbal Carbajo y Pato Kandus fueron la voz del consejo y del aliento del que va un paso adelante.

...Mariana León, Lorena Zapata y Hernán Burrieza compartieron conmigo muchas cursadas y momentos de la vida universitaria.

...La Pipi y Leíto mis amigos de “Mosquitos” estuvieron siempre conmigo.

...conocí a Uriel, quien además de su aliento me brindó muchas posibilidades de crecimiento.

...Delmi Canale y Raúl Stariolo desde Córdoba han hecho llegar siempre su ayuda.

...el grupo de voluntarios del Hospital Pirovano nos permitió sumarnos a sus tareas y brindó su amistad. Especialmente quiero agradecer a Cristina Piazza, José María Cohen, Horacio Lopez Alcoba, Rina Villanueva y Lucía Pons.

...Dos instituciones me abrieron sus puertas de par en par, el Inst. Nac. de Parasitología “Dr Mario Fatała Chabén”-ANLIS y el “Laboratorio de Chagas” INGEBI-CONICET. En el nombre de sus directores Dr. Andrés Ruiz y Dr. Mariano Levin quiero expresar mi agradecimiento a TODAS las personas que en ellos trabajan. Pero MUY especialmente quiero agradecer a la Bioq. Cristina Maidana y a la Dra Mónica Esteva y al Lic. Juan Burgos y a la Bioq. Margarita Bisio.

...mis amigas del colegio y en especial Maggy y Paula estuvieron presentes compartiendo el paso a paso.

...tuve el apoyo incondicional e invarolable de mi familia, y en especial de Fede...Sin este sustento basal nada de lo que aquí sigue hubiera sido posible.

...Tomás ha iluminado mis pasos con su existencia desde el 02 de agosto del 2006.

...Todas las familias santiagueñas que visitamos durante nuestro trabajo nos brindaron su calidez y apoyo incondicionales.

A todos aquellos que me acompañaron...muchas gracias.

El presente trabajo ha sido realizado gracias al financiamiento de las siguientes instituciones:
1) Fogarty International Center and the National Institute of Environmental Health Sciences (NIH Research Grant # R01 TW05836), 2) Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica, 3) Universidad de Buenos Aires y 4) Consejo Nacional de Actividades Científicas y Técnicas (CONICET).

TABLA DE CONTENIDOS

	<i>Página</i>
Presentación	xv
Capítulo I. Eco-epidemiología de la Enfermedad de Chagas	1
1. Introducción	2
1.1 La Enfermedad de Chagas	2
1.2 El ciclo doméstico de transmisión de <i>T. cruzi</i>	5
1.3 El <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.4 Aporte de la Eco-epidemiología al estudio de la Enfermedad de Chagas	13
2. Objetivos generales	16
Capítulo II. Efectos de la vigilancia vectorial sostenida luego de un rociado comunitario con insecticidas sobre la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> en <i>Triatoma infestans</i>, perros y gatos.	17
Resumen	18
2.1.1 Introducción	19
2.1.2 Objetivos particulares	20
2.1.3 Hipótesis de trabajo	20
2.2 Materiales y Métodos	20
2.2.1 Área de estudio	20
2.2.2 Colección de triatominos	21
2.2.3 Animales domésticos	23
2.2.4 Serodiagnóstico y xenodiagnóstico	23
2.2.5 Análisis de datos	24
2.3. Resultados	26
2.3.1 Infestación por triatominos	26
2.3.2 Demografía de las poblaciones de perros y gatos	28
2.3.3 Infección por <i>T. cruzi</i> en perros	28
2.3.4 Infección por <i>T. cruzi</i> en gatos	30
2.3.5 Comparación entre técnicas serológicas	31

	<i>Página</i>
2.3.6 Distribución de la infección por <i>T. cruzi</i> en animales domésticos	31
2.3.7 Infección por <i>T. cruzi</i> y factores de riesgo potenciales	33
2.3.8 Incidencia de infección por <i>T. cruzi</i> en perros	35
2.4. Discusión	36
2.4.1 Efectos de la vigilancia sostenida sobre la transmisión de <i>T. cruzi</i>	36
2.4.2 Prevalencia de infección por <i>T. cruzi</i> en perros	36
2.4.3 <i>T. infestans</i> y la transmisión vectorial	37
2.4.4 Distribución de la infección por <i>T. cruzi</i>	38
2.4.5 Efectos de la residencia local estable	39
2.4.6 Transmisión del <i>T. cruzi</i> por la vía oral	40
2.4.7 Infección por <i>T. cruzi</i> en gatos	40
2.4.8 Métodos de diagnóstico empleados	41
2.4.9 Los perros como centinelas de la transmisión vectorial	41
2.4.10 Limitaciones del estudio	41
2.5 Conclusiones	42
Capítulo III. Impacto del control vectorial comunitario sobre la infestación doméstica y la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
Resumen	44
3.1.1. Introducción	45
3.1.2 Objetivos particulares	46
3.1.3 Hipótesis de trabajo	47
3.2. Materiales y métodos	47
3.2.1 Área de estudio	47
3.2.2 Colección de triatominos	49
3.2.3 Animales domésticos	49
3.2.4 Análisis de datos	50
3.3. Resultados	52
3.3.1 Características de las áreas estudiadas	52
3.3.2 Infestación por triatominos	52

	<i>Página</i>
3.3.3 Infección por <i>T. cruzi</i>	53
3.3.4 Demografía de las poblaciones de perros y gatos	55
3.3.5 Prevalencia de <i>T. cruzi</i> por edad en perros y gatos	57
3.3.6 Infectividad al vector	58
3.3.7 Distribución de la infección por <i>T. cruzi</i>	61
3.3.8 Comparación entre técnicas serológicas	61
3.3.9 Infección por <i>T. cruzi</i> y factores de riesgo potenciales	63
3.4. Discusión	65
3.4.1 Comparación entre áreas	65
3.4.2 Prevalencia por edad y acciones de control vectorial	65
3.4.3 Comparaciones demográficas entre áreas	66
3.4.4 Factores de riesgo para la infección por <i>T. cruzi</i> en perros	66
3.4.5 Uso de los perros como centinelas de la transmisión	67
3.4.6 Agregación de la infección	67
3.4.7 Limitaciones del estudio	68
3.5 Conclusiones	69
Capítulo IV. Uso de un ensayo inmunocromatográfico rápido para la detección de anticuerpos contra <i>Trypanosoma cruzi</i> en reservorios animales	70
Resumen	71
4.1.1. Introducción	72
4.1.2 Objetivo particular	73
4.2. Materiales y Métodos	73
4.2.1 Sueros examinados	73
4.2.2 Ensayo inmunocromatográfico	74
4.3. Resultados	76
4.4. Discusión	78
4.4.1 Desempeño del ensayo evaluado	78

	<i>Página</i>
4.4.2 Potenciales ventajas del ensayo evaluado	79
4.4.3 Limitaciones del estudio	80
4.5 Conclusiones	80
Capítulo V. Epidemiología molecular de la infección silvestre y doméstica por <i>Trypanosoma cruzi</i> en el Noroeste de Argentina	81
Resumen	82
5.1.1 Introducción	83
5.1.2 Objetivos particulares	84
5.1.3 Hipótesis de trabajo	84
5.2. Materiales y Métodos	84
5.2.1 Área de estudio	84
5.2.2 Colección de triatomíneos	84
5.2.3 Animales domésticos	85
5.2.4 Humanos	85
5.2.5 Mamíferos silvestres	86
5.2.6 Aislamiento de parásitos	86
5.2.7 PCR	87
5.2.8 Análisis de datos	87
5.3. Resultados	88
5.3.1 Infección por <i>T. cruzi</i>	88
5.3.2 Hemocultivos	90
5.3.3 Linajes de <i>T. cruzi</i> prevalentes	90
5.3.4 Distribución de linajes de <i>T. cruzi</i> por hospedador	91
5.3.5 Distribución de linajes de <i>T. cruzi</i> por vivienda	94
5.3.6 Infectividad al vector	96
5.4. Discusión	96
5.4.1 Los perros y gatos como principales reservorios domésticos	96
5.4.2 Distribución de linajes por hospedador	97
5.4.3 Los linajes parasitarios de humanos	98

	<i>Página</i>
5.4.4 Los ciclos de transmisión doméstico y silvestre	99
5.4.5 Limitaciones del estudio	101
5.5 Conclusiones	102
Capítulo VI. Conclusiones	103
Referencias bibliográficas	106
Anexo I	124

PRESENTACIÓN

La presente tesis comprende seis capítulos y el contenido de cada uno de ellos se detalla a continuación:

El primer capítulo describe las características biológicas y epidemiológicas de la enfermedad de Chagas y de su agente etiológico, el protozoo *Trypanosoma cruzi*; así como el rol de los perros, gatos y gallinas en la transmisión doméstica y los antecedentes de su estudio en nuestro país. Se describen las características del abordaje de esta problemática desde la eco-epidemiología, y se presentan los objetivos generales de la tesis.

El segundo capítulo describe los efectos a largo plazo de la vigilancia vectorial sostenida luego de un rociado comunitario con insecticidas sobre la infección por *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans*, perros y gatos y sobre la incidencia de infección en perros los cuales fueron utilizados como centinelas de la transmisión doméstica, así mismo se estudiaron los factores de riesgo asociados a la infección por *T. cruzi*.

En el tercer capítulo se determinó el impacto relativo de dos estrategias de control vectorial comunitarias sobre la infestación por *T. infestans* y la infección por *T. cruzi* en *T. infestans*, perros y gatos domésticos en dos áreas rurales vecinas y se analizó la distribución por viviendas de la infección por el parásito y la infectividad al vector de los hospedadores infectados.

En el cuarto capítulo se evaluó un dispositivo comercial para la detección de infección por *T. cruzi* en muestras de sueros de perros provenientes de áreas endémicas y no endémicas con el fin de determinar su sensibilidad y especificidad y su aplicabilidad en los tamizajes a campo.

El quinto capítulo está dedicado a la integración de los resultados de los capítulos anteriores mediante un enfoque epidemiológico molecular en el que se determinó la distribución de linajes de *T. cruzi* (identificados mediante estrategias de PCR) en *T. infestans*, perros y gatos domésticos, humanos y mamíferos silvestres de dos áreas rurales vecinas con diferente historia de transmisión y control vectorial con el fin de comprender cuál es la estructura de los ciclos de transmisión del parásito y si existe una conexión entre ellos.

El capítulo final tiene por objetivo delinear las posibles consecuencias que tendrían los resultados obtenidos para el control de la transmisión de *T. cruzi* en comunidades rurales del Gran Chaco.

Capítulo I

Eco-epidemiología de la Enfermedad de Chagas

1. Introducción

1.1. La Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, es la principal enfermedad parasitaria en las Américas por su “carga de enfermedad” donde causa estimadamente 0,67 millones de años saludables de vida perdidos debido a la discapacidad o muerte prematura causada por la enfermedad (AVADs, años de vida ajustados por discapacidad) (disability adjusted life years) (WHO, 2002). Se estima que 10-18 millones de personas están actualmente infectadas y cerca de 100 millones en riesgo de infectarse (Schofield y col., 2006; WHO, 2004). La infección por *T. cruzi* es de por vida y suelen distinguirse dos fases de la infección. La fase aguda es corta, con una duración de dos a cuatro meses y suele presentarse como un cuadro febril que puede o no estar acompañado de otros síntomas generales o cursarse de manera asintomática. Las manifestaciones clínicas durante esta etapa dependen de diversos factores, como la edad del paciente, la forma de contagio, el inóculo de parásitos, entre otras (Rassi y col., 2000). Durante esta fase los parásitos pueden detectarse en sangre y para el diagnóstico en laboratorio se emplean métodos parasitológicos que incluyen la búsqueda de parásitos en sangre por medios directos (ya sea en fresco o a través de técnicas de concentración) (Luquetti y Rassi, 2000). Se estima que la mortalidad de la fase aguda es del 10% y afecta especialmente a los niños (Luquetti y Rassi, 2000; Miles y col., 2003). La fase aguda es seguida por una fase crónica, que puede presentarse de manera indeterminada (ausencia de síntomas clínicos) o con las manifestaciones crónicas características de esta enfermedad. La fase crónica es caracterizada por una muy baja parasitemia. Para el diagnóstico en laboratorio de la enfermedad en esta fase se emplean principalmente técnicas serológicas que reconocen anticuerpos específicos contra el parásito (Luquetti y Rassi., 2000). La fase asintomática puede durar decenas de años en algunos pacientes o permanecer asintomáticos por toda la vida (Pinho Ribeiro y da Costa Rocha, 2000). Sin embargo, una fracción de aproximadamente el 30% de los seropositivos puede desarrollar las manifestaciones crónicas de la Enfermedad de Chagas, que principalmente son cardiopatía, megacolon y/o megaesófago. Se estima que en aproximadamente un tercio de ellos estas manifestaciones son significativas y pueden asociarse a un desenlace fatal (Marin-Neto y col., 2000; Oelemann y col., 1999).

T. cruzi es mayormente transmitido de manera vectorial a través de insectos triatominos y también puede transmitirse verticalmente o por transfusiones de sangre y trasplante de órganos (Prata, 2001). La transmisión vectorial es la de mayor importancia,

siendo la causante de la mayor parte de los casos en humanos (Schmuñis, 2000). En ausencia de una vacuna efectiva, la prevención de esta vía de transmisión consiste en el rociado residual de las viviendas con insecticidas y el mejoramiento de las mismas para evitar la proliferación del vector. Existen más de un centenar de especies de triatomos y más de 70 han sido halladas naturalmente infectadas por *T. cruzi* (Sherlock y col., 1998). Sin embargo, tan sólo una decena de especies son de importancia epidemiológica para la transmisión doméstica de la enfermedad. *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y *Triatoma infestans* (Klug, 1834) son las principales especies vectores del ciclo doméstico en el continente americano (Minter, 1976; Sherlock, 2000).

La incidencia del Chagas congénito, es decir, de hijos que nacen infectados de madres seropositivas es de muy difícil estimación y está sujeta a diversas fuentes de error. Sin embargo, algunos estudios la estiman en un 2-3% anual, variando desde un 1,6% para Argentina y Brasil hasta un 8% en Bolivia (Schmuñis, 2000). En la Argentina se estima que cada año ocurren alrededor de 1000 nuevos casos de Chagas por esta vía (Gürtler y col., 2003; Schmuñis, 2000), pero este promedio enmascara una marcada diferencia entre provincias (Gürtler, 2007). Para controlar esta vía de transmisión en Argentina, en la actualidad se realiza por ley un análisis de sangre de la mujer embarazada para determinar su infección por *T. cruzi* y en caso de resultar positiva, efectuar el seguimiento necesario del bebé para diagnosticar la eventual infección congénita. Para la prevención de la transmisión transfusional y por transplante de órganos se realiza el tamizaje de los donantes de sangre y órganos, cuya obligatoriedad está amparada por leyes nacionales en Brasil y Argentina desde 1980, países pioneros en esta legislación (Segura y col., 2000). En la Argentina se estima que el 100% de los donantes de sangre son tamizados y la prevalencia de infección por *T. cruzi* estimada en ellos en 1995 era del 4,9% (Schmuñis, 2000). Sin embargo, la cobertura del tamizaje es muy dispar entre los países americanos y para el año 1995, apenas alcanzaba el 46% en Colombia, donde se estimaba que el 1,3% de los donantes estaban infectados, o el 66% en Bolivia, donde la prevalencia entre donantes era del 13,7% (Albarracin-Veizaga y col., 1999; Schmuñis, 2000). Aunque se han registrado microepidemias asociadas a la transmisión oral de la Enfermedad de Chagas por la ingestión de alimentos contaminados, esta vía de transmisión era muy poco frecuente y ha ido aumentando en forma sostenida (Prata, 2001; Steindel y col., 2008).

A lo largo de toda América la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas se desarrolla mayoritariamente en el ambiente rural (Storino y Milei, 1994), especialmente

asociada a viviendas de construcciones precarias o “ranchos” (Briceño-León, 1990). Según la Real Academia Española se entiende por “rancho” a una choza o casa pobre con techumbre de ramas o paja, fuera de poblado. Ya en los años 1950s diversos autores afirmaron que “este predominio rural de la enfermedad de Chagas es más aparente que real, pues esta enfermedad no está determinada por el medio, sino por las condiciones especiales que suele reunir la vivienda humana deficitaria” (Mayer y Alcaraz, 1954; Nájera y col., 1950). Medio siglo más tarde, la población rural sigue sufriendo el azote de este flagelo (Médicos Sin Fronteras, 2005). Como diría Briceño-León (1990) “la enfermedad de Chagas es una dolencia social”. Sin ignorar su complejidad y multicausalidad, podríamos afirmar que esta enfermedad está estrechamente asociada a poblaciones rurales caracterizadas por un muy bajo Índice de Desarrollo Humano en sus tres dimensiones (baja esperanza de vida, elevada analfabetización y muy bajo ingreso per cápita), con necesidades básicas insatisfechas, muchas veces sometidas a formas de producción semif feudales y distanciadas de los centros urbanos por caminos de tierra intransitables en épocas de lluvias (Pinto, 1942). Es este aspecto socio-económico de la enfermedad probablemente lo que adiciona un grado de complejidad aún mayor a las perspectivas de su control. La implementación de medidas de lucha antivectorial, por ejemplo no resuelve el escaso acceso al diagnóstico o al tratamiento (o al sistema de salud en general) de la mayoría de los infectados chagásicos.

En los últimos años, ha emergido el problema de la urbanización de la enfermedad de Chagas, ya sea por la infestación por triatominos de viviendas precarias en las zonas periurbanas de diversas ciudades con el consiguiente elevado riesgo de transmisión del *T. cruzi* como es el caso de Arequipa en Perú (Bowman y col., 2008; Levy y col., 2006); como por la emigración de infectados hacia las ciudades o hacia países no endémicos incluyendo el continente europeo (Gascón y col., 2008). Probablemente esto se deba a los retrocesos de las acciones de control de los programas de salud de los países afectados y a la continua migración de personas desde el medio rural al urbano (Briceño-León, 2003).

La transmisión vectorial del *T. cruzi* se caracteriza por tener una gran diversidad de actores (vectores, hospedadores, parásitos involucrados) a lo largo de continente. Se han reconocido dos principales ciclos de transmisión, el doméstico y el silvestre. Estos pueden ocurrir simultánea e independientemente involucrando distintos vectores y reservorios, o pueden ocurrir en simpatria con diferentes grados de solapamiento e interrelación (Diotaiuti y col., 1995). El ciclo silvestre de transmisión de *T. cruzi* presenta una amplia distribución geográfica, encontrándose asociado a diferentes especies de vectores y hospedadores en los distintos lugares. Más de 150 especies de mamíferos silvestres han sido hallados naturalmente

infectados con *T. cruzi*, mientras que las aves, los reptiles y otros vertebrados son refractarios a la infección. En nuestro país, los registros de infección por *T. cruzi* en mamíferos incluyen a comadrejas, zorrinos, hurones, monos, armadillos, mulitas y diversas especies de roedores (*Calomys musculus*, *Calomys laucha*, *Akodon dolores*, *Akodon azarae*, *Octodontomys gliroides*) (Bar y col., 1999; Basso y col., 1977, 1982; Mazza, 1930; Mazza y Schreiber, 1938; Moretti y col., 1980; Schweigmann y col., 1992; Wisnivesky-Colli y col., 1992).

1.2. El ciclo doméstico de transmisión de *T. cruzi*

La transmisión de *T. cruzi* a humanos es más intensa en el ambiente doméstico, se enmarca en un escenario de viviendas precarias donde la actriz principal es la pobreza y los demás protagonistas son las vinchucas, los humanos, y diversos animales domésticos como los perros, gatos y roedores (Minter, 1976; Mott y col., 1978). El ciclo doméstico de transmisión de *T. cruzi* presenta características diversas dependiendo de la especie que sea el vector domiciliario principal, su preferencia alimentaria por determinados hospedadores y las costumbres de la región. Así es como se reconocen ciclos que involucran a comadrejas, perros, *R. prolixus* y humanos en Venezuela; perros, gatos, roedores, comadrejas, *T. dimidiata* y humanos en Costa Rica; y perros, gatos, *T. infestans* y humanos en los países del cono sur de América del Sur (Minter, 1976). En aquellos lugares donde los habitantes habitualmente los crían como fuentes de alimento, como en Bolivia y Perú, los cobayos pueden formar parte del ciclo doméstico junto con los perros, los gatos, los humanos y *T. infestans* (Albarracín-Veizaga y col., 1999; Minter, 1976; Zeledón, 1974).

El rol de los animales domésticos en la transmisión doméstica de *T. cruzi* ha sido objeto de controversia y de variados estudios. Para el caso de las aves de corral, y en especial de las gallinas la discusión se centraba en si tenían un efecto global beneficioso para la transmisión vectorial doméstica (al reducir la tasa global de infección por *T. cruzi* en los vectores y algún efecto predador) o el contrario (al sustentar poblaciones de vectores más abundantes) (Minter, 1976). Estudios realizados en comunidades rurales del noroeste argentino donde el principal vector doméstico es *T. infestans* demostraron que la presencia de gallinas en el interior de las viviendas contribuye notablemente al desarrollo del ciclo doméstico, ya que al ser una importante fuente de alimentación para las vinchucas favorece el crecimiento poblacional del vector (Cecere y col., 1997, 1998; Cohen y Gürtler, 2001; Gürtler y col., 1998).

Para el caso de los gatos domésticos el eje de la discusión era si su rol en la transmisión doméstica de *T. cruzi* consistía en ser reservorios de parásitos o simples

hospedadores accidentales o “dead ends”. La significación de un hospedador como reservorio depende, principalmente, de su prevalencia de infección, de su capacidad para infectar al vector (i.e., infectividad), y de su tasa de contacto con el vector. (Cohen y Gürtler, 2001). Desde Texas (EEUU) hasta nuestro país se han reportado casos de perros infectados con *T. cruzi*. La prevalencia de infección en ellos es muy variable a lo largo del continente. Esta distribución geográfica tan amplia de la infección en perros probablemente refleje la estrecha cercanía que tienen estos animales con sus dueños, y a la vez, la abundancia de la población canina doméstica. Los perros han sido considerados importantes reservorios domésticos de *T. cruzi* en diversos países endémicos (Basombrío y col., 1993; Cedillos y col., 1976; Marsden, 1997; Minter, 1976; Mott y col., 1978; Pinto Dias, 2000; Zeledón, 1974), especialmente en áreas rurales donde *T. infestans* es el principal vector doméstico (Minter, 1976). Tal es el caso del norte de nuestro país, donde los perros actúan como una de las principales fuentes de sangre para los *T. infestans* domésticos (Gürtler y col., 1990, 2005; Lauricella y col., 1989; Wisnivesky-Colli y col., 1985) y presentan elevados niveles de prevalencia de infección en ausencia de medidas de control vectorial (hasta un 84% registrado en la provincia de Santiago del Estero, Gürtler y col., 2007). Tanto los perros como los gatos han mostrado una elevada infectividad a los vectores y una incidencia de infección 10 veces mayor que la respectiva población de niños de un área con transmisión activa (Gürtler y col., 2005). En base a estos hallazgos, se ha propuesto que los perros constituyen centinelas naturales de la transmisión de *T. cruzi* luego del rociado con insecticidas (Gürtler y col., 1990; Castañera y col., 1998).

Triatoma infestans, el vector principal de la Enfermedad de Chagas en el cono sur de América del Sur, ha sido el blanco de varios programas de control vectorial durante décadas. La Iniciativa del Cono Sur, un esfuerzo regional para eliminar *T. infestans* e interrumpir la transmisión de *T. cruzi*, fue lanzado en 1991 (Pinto Dias y col., 2002). Hasta el momento, la transmisión vectorial a humanos por *T. infestans* ha sido interrumpida en Chile, Uruguay, Brasil y partes de Paraguay, y en las provincias de La Pampa, Río Negro, Neuquén, Jujuy y Entre Ríos en la Argentina (Pinto Dias y col., 2002, Schofield y col., 2006; WHO, 2002; Zaidemberg y col., 2004). Sin embargo, la transmisión no ha sido interrumpida en el Gran Chaco, una región natural que abarca el norte de Argentina, el este de Bolivia y oeste de Paraguay donde 4 millones de personas viven en base a una economía de subsistencia (Gürtler, 2007).

A pesar de claros progresos relativos a lo largo de cuatro décadas, los programas de control vectorial a lo largo de América Latina todavía se enfrentan a la reinfestación recurrente como el principal problema que amenaza los intentos de eliminación,

especialmente en áreas rurales con poblaciones muy dispersas donde las acciones de control oficiales son esporádicas (WHO, 2007). En el Norte argentino, luego de una aplicación única de deltametrina en todos los domicilios de una comunidad rural y en ausencia de medidas de vigilancia entomológica, la reinfestación a los 3-7 años luego del rociado resultó en infestaciones domésticas por *T. infestans* con niveles similares a los del estudio de base y dio lugar a una renovada transmisión (Gürtler y col., 1994, 2005). En la misma área, un rociado subsiguiente de todas las viviendas con deltametrina que incluyó también todas las estructuras peridomésticas y fue seguido de vigilancia vectorial y acciones de control selectivas, redujo fuertemente la abundancia de *T. infestans* (especialmente en los domicilios) y la prevalencia de *T. cruzi* en vinchucas y perros en los 5 años posteriores a la intervención (Castañera y col., 1998; Cecere y col., 1999, 2002). En ese periodo, en presencia de poblaciones de muy baja densidad de *T. infestans* o del vector secundario *Triatoma guasayana*, se detectaron nuevos casos de infección en perros pero éstos también podrían atribuirse a la transmisión vertical. El programa de vigilancia entomológica se basó en la participación comunitaria combinada con rociados profesionales focales durante 1993-1995, y en rociados selectivos realizados por los propios moradores y líderes comunitarios entre 1996-2004 (Cecere y col., 1999, 2002) y las actividades fueron monitoreadas regularmente por el grupo de investigación.

1.3. El *Trypanosoma cruzi*

Su clasificación taxonómica es la siguiente: (tomado de Stevens y Brisse, 2004)
Subreino PROTOZOA Goldfuss, 1818; emend. Levine y col., 1980,
Phylum SARCOMASTIGOPHORA Honigberg y Balaniuth, 1963; emend. Levine y col.,
1980
Subphylum MASTIGOPHORA Diesing, 1966; emend. Levine y col., 1980
Clase ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909
Orden KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963
Familia TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901; emend. Grobden, 1905
Género TRYPANOSOMA Gruby, 1843
Subgénero Schizotrypanum Chagas, 1909
Trypanosoma (Schizotrypanum) *cruzi* Chagas, 1909

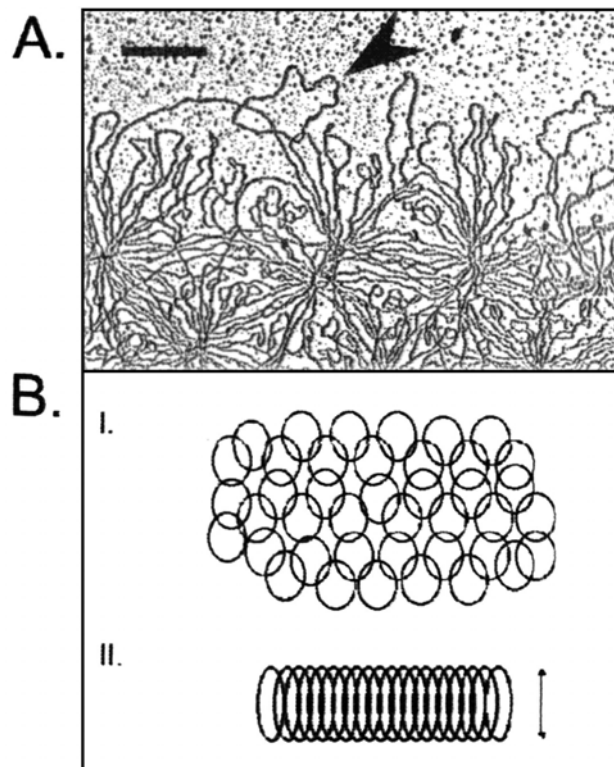
El *Trypanosoma cruzi* se caracteriza por tener un ciclo de vida complejo donde se alternan estadios en los hospedadores vertebrados como en los insectos vectores. En la sangre de los mamíferos se encuentran los tripomastigotes. Dentro de las células de los hospedadores mamíferos, hallados en pseudoquistes, se encuentran los amastigotes que representan las

formas reproductivas intracelulares de *T. cruzi*. Las formas epimastigotas corresponden al estadio reproductivo en el insecto vector y en los medios de cultivos axénicos. El desarrollo del ciclo dentro del vector tiene lugar enteramente en el lumen del tubo digestivo, y la transmisión se realiza a través de la contaminación con las heces del vector infectado. Los tripomastigotes ingeridos con la sangre se diferencian a epimastigotes, los cuales se multiplican en el intestino medio y finalmente se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el tramo final del intestino y en la ampolla rectal de los vectores (García y de Azambuja, 2000; Stevens y Brisse, 2004).

Como ocurre en los demás eucariotas, el *T. cruzi* posee dos genomas distintos situados en dos compartimentos celulares bien diferenciados: en el núcleo y en la mitocondria. Sin embargo, en los tripanosomatídeos, el ADN mitocondrial se encuentra de una manera peculiar ya que se lo encuentra formando una compleja red de moléculas circulares de ADN, denominada cinetoplasto (Figura 1.1A). Con el fin de contribuir al conocimiento del parásito y acrecentar las herramientas para el control de la Enfermedad de Chagas, en 1994, la Organización Mundial de la Salud, a través de su programa para el entrenamiento e investigación en enfermedades tropicales (TDR, Research and Training in Tropical Diseases) lanzó una red mundial para el estudio del genoma de *T. cruzi*, conocida como “*T. cruzi* Genome Network”. Recientemente se ha logrado la caracterización del contenido de genes y de la arquitectura del genoma de *T. cruzi* así como el análisis proteómico de todo el organismo incluyendo los cuatro estadios de su ciclo de vida (El-Sayed y col., 2005). Como frutos de este esfuerzo internacional se obtuvieron estimaciones del tamaño del genoma diploide, estimado entre 106,4 to 110,7 M bp, y se predijo que contendría unos 23.022 genes codificadores de proteínas de los cuales 12.574 representarían pares alélicos y 704 genes del ARN. Más del 50% del genoma estaría compuesto por secuencias repetitivas. Se estimó también que el proteoma consistiría en aproximadamente 6.200 genes organizados en grandes agrupaciones de genes policistrónicas (El-Sayed y col., 2005). Como complemento de la secuenciación del genoma, un análisis proteómico reciente ha identificado 1.168 grupos de proteínas abarcando los cuatro estadios del parásito, y se lograron identificar productos proteicos a partir de más de 1.000 genes considerados “hipotéticos” en el genoma secuenciado (Atwood y col., 2005). El proyecto genoma ha sido desarrollado en base a la cepa CL Brener (perteneciente al linaje *T. cruzi* IIe), sin embargo, comparaciones futuras de los genomas de diferentes cepas podrían permitir la identificación de genes asociados con patogenicidad o marcadores pronósticos. Esta fuente de datos genómicos y proteómicos constituye una poderosa herramienta para el diseño de nuevas estrategias para el diagnóstico, control

epidemiológico y manejo de la infección, así como para el desarrollo de vacunas e identificación de nuevos blancos para drogas que permitirían el desarrollo e implementación de terapias etiológicas innovadoras.

Figura 1.1. Estructura en forma de red del cinetoplasto (kADN) (tomada de Lukeš y col., 2002)



A. Micrografía electrónica de la periferia de una red de kADN aislada de *Trypanosoma avium*. Los bucles representan los minicírculos concatenados y con la punta de flecha se señala un ejemplo. La barra representa 500 nm.

B. Diagramas mostrando la organización de los minicírculos.

(I) Segmento de una red aislada esquematizando los minicírculos concatenados en un arreglo plano.

(II) Sección a través de un disco de red condensado in vivo mostrando los minicírculos estirados. La flecha con dos puntas indica el grosor del disco que es casi la mitad de la circunferencia del minicírculo.

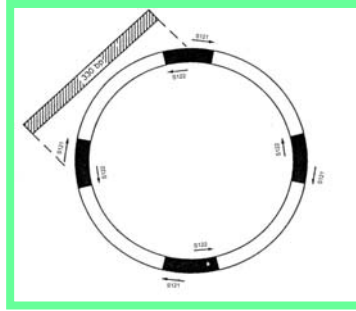
La genética de *T. cruzi*, igual que la de otros tripanosomas, presenta ciertas peculiaridades. En primer lugar, los cromosomas de los tripanosomas no se condensan durante la división celular lo que dificulta el análisis por métodos citogenéticos clásicos. En segundo lugar, la segregación de los cromosomas ocurre intranuclearmente, sin la disolución de la carioteca (da Silveira, 2000). Existe consenso de que en los protozoarios es relativamente común encontrar cromosomas homólogos de diferentes tamaños. La ploidía de

T. cruzi ha sido objeto de discusión y controversia. Sin embargo, existen evidencias indirectas (i.e., patrones de isoenzimas, hibridización de diferentes marcadores genéticos, etc.) de que *T. cruzi* sería un organismo diploide para la mayoría de sus cromosomas, aunque no se excluye la posibilidad de que existan cromosomas aneuploides y/o poliploides.

El genoma nuclear de *T. cruzi* está compuesto por secuencias de ADN que podrían agruparse en 3 clases: a) secuencias que codifican proteínas, b) secuencias que codifican ARNs; y c) secuencias repetitivas (ADN repetitivo). Existen también secuencias espaciadoras presentes entre genes codificadores de ARN o de proteínas que pueden contener elementos reguladores de la transcripción. Existe una gran variedad de secuencias repetitivas del ADN repetitivo en *T. cruzi* y se las agrupa principalmente en microsátélites, minisátélites, retrotransposones, retroposones y LINEs (“long interspersed nucleotide elements”). El tamaño de las secuencias puede variar desde unos pocos pares de nucleótidos hasta más de 5000 pares de bases (Requena y col., 1996), y pueden aparecer agrupadas o dispersas por el genoma. Aunque la mayoría de ellas no son codificadoras, dentro de este tipo de ADN se encuentran los genes codificadores de los ARN ribosomales 18S y 24S (con > 100 copias/genoma), del ARN de la secuencia líder (> 200 copias/genoma), entre otros.

El ADN del cinetoplasto (“kinetoplastid ADN”, kADN) está compuesto por dos tipos de moléculas circulares que difieren en tamaño y función, denominadas minicírculos y maxicírculos. Los minicírculos poseen cerca de 1400 pares de bases y están presentes en 10.000-20.000 copias por célula. Los minicírculos poseen 4 regiones bastante conservadas de 120 a 160 pares de bases, intercaladas con las regiones variables que tienen cerca de 280-320 pares de bases (Figura 1.1 B y Figura 1.2). Las secuencias presentes en los minicírculos no codifican proteínas pero se transcriben generando ARN guías cuya función es la edición de los ARNs de las enzimas mitocondriales. Los maxicírculos poseen aproximadamente 40.000 pares de bases y tienen entre 20 y 50 copias por célula. Los maxicírculos codifican las proteínas mitocondriales y dos ARNs mitocondriales.

Figura 1.2. Estructura de los minicírculos



C. Esquema de un minicírculo, con alternancia de segmentos con secuencias hipervariables (en blanco) y de segmentos con secuencias altamente conservadas (en negro).

La expresión génica en *T. cruzi* posee características particulares tales como la organización de los genes de proteínas en unidades transcripcionales policistrónicas; el procesamiento de transcritos a través del “trans-splicing” y la edición del ARN; además de la existencia de promotores y polimerasas de ARNs poco convencionales. En *T. cruzi*, la organización de los promotores de genes de ARNs ribosomales (ARNrs) y del ARN de la secuencia líder es semejante a la organización de los promotores de los genes de ARNs de los eucariotas. Sin embargo, para los genes codificadores de proteínas hasta el momento no ha sido posible identificar secuencias promotoras consenso en las regiones flanqueantes. Esto sugiere que el control de la expresión génica de estos tripanosomas ocurriría principalmente al nivel post-transcripcional, involucrando el procesamiento y la traducción de los transcritos.

Los ARNs mensajeros (ARNms) de los tripanosomatídeos presentan en el extremo 5' una secuencia extremadamente conservada de 39 nucleótidos denominada “secuencia líder” o mini-exón. La secuencia líder se adiciona al pre-ARNm a través de un mecanismo de “trans-splicing” y estaría presente en todos los ARNms del tripanosoma ya que parecería que los transcritos desprovistos de ella pierden su estabilidad y no son traducidos. Tal como ocurre en los demás eucariotas, los ARNms presentan en su extremo 3' una cadena de poli A.

Quizás uno de los rasgos más llamativos de *T. cruzi* es su diversidad genética. Las poblaciones de este parásito difieren entre sí según criterios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y clínicos. En *T. cruzi* la reproducción sexual es muy rara (aunque no inexistente) y las poblaciones del parásito tienen una estructura eminentemente clonal (Tibayrenc y col., 1986). En consecuencia, los conceptos básicos

como especie, especiación, aislamiento reproductivo o cepa no son fácilmente aplicables para este parásito. Sin embargo, el término “cepa” ha sido muy utilizado en la bibliografía correspondiente para designar al aislamiento de parásitos a partir de un hospedador vertebrado o invertebrado.

Según Tibayrenc y col. (1986), la heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi* podría ser explicadas por dos hipótesis alternativas pero no mutuamente excluyentes. En una de ellas, el grado de diversidad existente entre los aislados del parásito reflejaría el intervalo de tiempo existente desde la evolución a partir de un ancestro común. Durante la evolución clonal, se incorporarían características biológicas y bioquímicas en los diferentes clones, de manera tal que las diferencias existentes entre ellos serían un reflejo de intervalo de tiempo existente entre la evolución de cada uno de ellos a partir de un ancestro común. En este caso podría existir una correlación entre las características bioquímicas y biológicas de los clones. En la segunda hipótesis, la variabilidad de las características biológicas sería una adquisición reciente y reflejaría la adaptación del parásito a los diferentes ciclos de transmisión. En este caso, las características bioquímicas podrían haber evolucionado antes de otras características biológicas del parásito, y por lo tanto no habría correlación entre las propiedades bioquímicas de un dado clon y sus propiedades clínicas.

La identificación de linajes, aislados naturales y cepas de *T. cruzi*, y el estudio del polimorfismo de las poblaciones se ha realizado utilizando una diversidad de marcadores bioquímicos y moleculares (Macedo y col., 2004). Según Macedo y col. (2002), históricamente podemos delinear distintas etapas en la concepción de la importancia de la variabilidad genética del parásito y su relación con la patogénesis de la Enfermedad de Chagas. En los comienzos, los estudios concentraron sus esfuerzos en asociar la variabilidad del parásito con las distintas formas clínicas de la enfermedad encontradas en los humanos, lo que resultó infructuoso. Esta etapa fue seguida por otra en la que el rol del parásito en la patogénesis fue relegado a un segundo plano y el foco se centró en la respuesta inmune del hospedador y en los epítopes del parásito que causarían una respuesta inmune cruzada. En la actualidad, la enfermedad es vista como el producto de la interacción de dos genomas altamente variables: el del parásito y el del hospedador humano (Macedo y col., 2002). En los comienzos, la metodología más utilizada para estudiar la diversidad genética de *T. cruzi* fue el análisis del perfil de isoenzimas (Miles y col., 1977, 1978). Con posterioridad se han aplicado una variedad de técnicas y marcadores moleculares como el análisis del perfil de la digestión del ADN del

cinetoplasto con enzimas de restricción, DNA fingerprinting, RAPD, SSR-PCR, LSSP-PCR y el estudio del polimorfismo de secuencias microsátélites entre otras (revisadas en Macedo y col., 2002).

Actualmente, *T. cruzi* ha sido clasificado en seis subdivisiones genéticas discretas o linajes, designados como *T. cruzi* I (TC I), *T. cruzi* IIa (TC IIa), *T. cruzi* IIb (TC IIb), *T. cruzi* IIc (TC IIc), *T. cruzi* IId (TC IId) y *T. cruzi* IIe (TC IIe) (Tibayrenc, 2003; Brisse y col., 2001). Estos linajes aparentemente se distribuyen diferencialmente entre las diversas especies de triatomíneos, hospedadores vertebrados y hábitats en distintas áreas geográficas (Higo et al., 2004, Yeo y col., 2005). A pesar de que todos los linajes de *T. cruzi* pueden causar la enfermedad en humanos, algunos estudios sugieren que *T. cruzi* IIb, IId y IIe estarían más asociados con ambientes antrópicos y con pacientes con enfermedad de Chagas crónica; *T. cruzi* IIa y IIc con ambientes silvestres, y *T. cruzi* I con ambos (Telleria y col., 2006; Yeo y col., 2005). Aunque existen numerosos estudios sobre la diversidad genética de las poblaciones de *T. cruzi*, ha existido una tendencia a re-examinar los aislados de parásitos disponibles. Por lo tanto, resultan necesarios estudios detallados de aislados provenientes de la escala de una localidad para poder comprender mejor la diversidad genética y la dinámica de la transmisión de *T. cruzi* (Miles y col., 2003).

1.4. Aporte de la Eco-epidemiología al estudio de la Enfermedad de Chagas

Según Susser y Susser (1996), estamos asistiendo a un cambio de paradigma en la investigación epidemiológica aplicada a la salud pública. Estos autores plantean la sucesión de diferentes corrientes de pensamiento en la investigación epidemiológica o “eras” con diferentes objetos de estudio y paradigmas correspondientes (Tabla 1.1).

La complejidad de los sistemas donde se desarrollan las enfermedades requiere de una mirada integradora, más allá del estudio de los factores de riesgo o de los mecanismos moleculares de infección a nivel del individuo aislado. A modo de ilustración, los autores proponen como ejemplo la epidemia de HIV-SIDA. En el caso del HIV las causas inmediatas de la infección y los factores de riesgo son conocidos, pero este conocimiento tiene dificultades para traducirse en medidas de protección eficaces para la salud pública. Es decir, la aplicación de la investigación epidemiológica tal como se la aplicaba para el estudio de las enfermedades crónicas con su paradigma de “la caja negra” no permite elucidar por sí sola los mecanismos necesarios para generar cambios de conductas y de esta manera impactar en la salud. En consecuencia, resulta necesario

incorporar la apreciación sistémica del problema propia de la ecología. La implicancia práctica de localizar la investigación epidemiológica dentro del paradigma ecológico es que el foco exclusivo en los factores de riesgo al nivel individual (dentro de las poblaciones) no resulta suficiente aunque se estudie una gran cantidad de individuos. Es necesario por lo tanto estudiar las relaciones causales tanto al nivel de la sociedad como la patogénesis y sus causas al nivel molecular.

Lo que se propone es un enfoque de la salud abarcativo, dinámico, de múltiples escalas, desde el nivel molecular hasta el de comunidades y sistemas, y en el cual se reconozcan no sólo las diferencias de niveles sino también las interrelaciones que existen entre ellos (March y Susser, 2006). Para esto es imprescindible un trabajo colaborativo e integrador de las diferentes fuentes de conocimiento. Dentro de este marco es que se han desarrollado los trabajos realizados en la presente tesis, los cuales forman parte de un estudio prospectivo de largo plazo apuntado al modelado y control de la transmisión de *T. cruzi* en un área rural bien definida en el noroeste argentino desde diferentes disciplinas y perspectivas.

Tabla 1.1. Eras en la evolución de la epidemiología moderna y una era emergente

(Tomado de March y Susser, 2006)

Era	Paradigma	Aproximación analítica	Aproximación preventiva
Estadística sanitarista (1 ^a mitad del siglo XIX)	Miasma: envenenamiento por emanaciones impuras del suelo, aire y el agua	Demostración de la agregación de la morbilidad y mortalidad	Introducción de drenajes, cloacas y políticas de saneamiento ambiental.
Enfermedades infecciosas (fin del siglo XIX hasta 1 ^a mitad del s. XX)	Teoría del germen: agentes particulares relacionados uno a uno a enfermedades específicas	Aislamiento y cultivo en laboratorio a partir de las lesiones causadas por la enfermedad, transmisión experimental y reproducción de la patología	Interrupción de la transmisión (vacunas, aislamiento de los afectados a través de cuarentena, y posteriormente antibióticos)
Epidemiología de las enfermedades crónicas (fin 2 ^a mitad del s. XX)	Caja negra: exposición relacionada al efecto, sin la necesidad de conocer los factores intervinientes o la patogénesis	Razones de probabilidad (“odds ratio” de los distintos niveles de exposición con respecto a los efectos, evaluadas al nivel individual dentro de las poblaciones	Controlar los factores de riesgo a través del cambio de conductas y estilos de vida (dieta, ejercitación física, etc.), de los agentes (armas, alimentos, etc.) o el ambiente (polución, contaminación con humo de cigarrillo para los fumadores pasivos, etc.)
Eco-epidemiología (emergente)	Cajas chinas: relaciones dentro y entre estructuras localizadas y organizadas en niveles jerárquicos.	Análisis de los determinantes de los efectos en los diferentes niveles de organización: dentro y entre contextos (usando nuevos sistemas de información) y en profundidad (usando nuevas técnicas biomédicas)	Aplicación de la información y la tecnología biomédica para implementar estrategias en los niveles necesarios (desde el contextual hasta el molecular) de manera de lograr cambios eficaces.

2. Objetivos generales

Con el fin de contribuir a un mayor conocimiento de la dinámica de la transmisión del *T. cruzi* en comunidades rurales del chaco argentino, este plan de trabajo tuvo por objetivos:

- Evaluar los efectos de la vigilancia vectorial sostenida sobre la infección por *T. cruzi* en perros y gatos en comunidades rurales del noroeste argentino.
- Evaluar el impacto relativo de dos estrategias de control vectorial sobre la infestación por *T. infestans* y la infección por *T. cruzi* en vectores, perros y gatos domésticos en dos áreas rurales vecinas.
- Determinar la sensibilidad y especificidad de un dispositivo comercial para una prueba rápida inmunocromatográfica para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en sueros caninos.
- Determinar la ocurrencia y distribución de linajes de *T. cruzi* en vectores, hospedadores domésticos y silvestres para establecer si los ciclos de transmisión doméstico y silvestre se solapan o existen independientemente en las áreas de estudio.

Capítulo II

Efectos de la vigilancia vectorial sostenida luego de un rociado comunitario con insecticidas sobre la infección por *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans*, perros y gatos.

Resumen

Los perros domésticos fueron propuestos como centinelas de la transmisión para evaluar prospectivamente el impacto a largo plazo de rociados con insecticidas piretroides sobre la transmisión de *T. cruzi* en comunidades rurales bajo vigilancia entomológica. En los años 2000 y 2002 se hallaron infestaciones leves por *Triatoma infestans* y en total se examinaron serológicamente o por xenodiagnóstico 523 perros y gatos. La prevalencia de infestación por *T. infestans* varió entre 12-18% en los sitios domésticos, y la prevalencia de infección por *T. cruzi* en los insectos domiciliarios fue del 8,8 y 4,5% para los años 2000 y 2002, respectivamente. La prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros disminuyó del 65% en 1992 (estudio de base) al 8,9% y 4,7% a los 7,5 y 10 años después de establecer una vigilancia vectorial sostenida, respectivamente. La fuerza anual promedio de infección cayó 260 veces, de 72,7 por cada 100 años-perro en el estudio de base a <0,3% en 2002, determinado tanto prospectivamente como retrospectivamente a partir de las curvas de prevalencia por edad de los perros nativos nacidos durante la vigilancia. Mediante un análisis de regresión logística múltiple se identificó que los casos prevalentes de infección canina en 2000 y en 2002 estaban asociados positiva y significativamente con el número máximo de *T. infestans* domésticos capturados en la casa del perro a lo largo de su vida. La sostenida declinación de la infección por *T. cruzi* en perros y gatos fue el resultado de los rociados selectivos con insecticidas realizados por la comunidad, los que mantuvieron la abundancia de *T. infestans* infectados a niveles marginales, una rápida tasa de recambio poblacional de los hospedadores, y una baja tasa de inmigración de perros desde áreas con transmisión activa.

2.1.1. Introducción

El progreso realizado en la interrupción de la transmisión de *T. cruzi* ha sido habitualmente demostrado a través de estudios de seroprevalencia en humanos (Felinciangeli y col., 2003; Hoff y col., 1985; Segura y col., 2000), pero problemas éticos y de aceptabilidad impiden el tamizaje regular de las poblaciones afectadas mediante pruebas serológicas que involucran la extracción de muestras de sangre. Sin embargo, los perros domésticos constituirían eficaces centinelas naturales de la transmisión de *T. cruzi* luego del rociado con insecticidas (Gürtler y col., 1990; Castañera y col., 1998) y su estudio permitiría evaluar la transmisión doméstica sin tamizar a los pobladores afectados.

Al momento de realizarse este estudio, había muy pocas evidencias empíricas sobre el rol preciso de los gatos en la transmisión doméstica de *T. cruzi* o como reservorios “puente” que unen los ciclos domésticos y silvestres de transmisión. Los trabajos previos que han estudiado la infección por *T. cruzi* en gatos en la región del Gran Chaco y en otras regiones son muy pocos (Minter, 1976), y se han basado principalmente en el xenodiagnóstico debido a las dificultades halladas en el manejo y extracción de muestras de sangre a los gatos domésticos en zonas rurales. En Brasil, estudios antiguos realizados mediante xenodiagnóstico revelaron una prevalencia de infección en gatos entre el 18-30% en áreas donde los vectores locales eran *T. infestans*, *P. megistus* o *T. brasiliensis* (Freitas, 1950; Alencar y col., 1974; Mott y col., 1978). En Argentina, los estudios en los que se examinaron más de 30 gatos hallaron prevalencias determinadas por xenodiagnóstico que variaron del 18 al 39% (Mayer y Alcaraz, 1954; Gürtler y col., 1993). En comunidades rurales de Santiago del Estero, el hallazgo de una menor frecuencia de los gatos como fuentes de alimentación de las *T. infestans* domésticas, propició la idea de que desempeñarían un rol menor en la transmisión doméstica (Wisnivesky-Colli, 1987). Sin embargo, los gatos infectados contribuyeron significativamente a la infección doméstica por *T. cruzi*, luego de ajustar por el número de perros infectados hallados en la vivienda (Gürtler y col., 1993, 2005). En un trabajo reciente en el que cuantificamos las tasas de adquisición de la infección de los perros y gatos domésticos, su infectividad al vector, y su grado de contacto con los *T. infestans* domésticos de las casas en que habitaban concluimos que tanto los perros como los gatos califican como hospedadores reservorios de *T. cruzi* y que aunque los gatos fueron menos abundantes que los perros, la evidencia indica que cuando están presentes los gatos contribuyen significativamente a la transmisión doméstica de *T. cruzi* (Gürtler y col., 2007).

Como parte de un estudio prospectivo de largo plazo apuntado al modelado y control de la transmisión de *T. cruzi* en un área rural bien definida en el noroeste argentino, en este trabajo usamos los perros domésticos como centinelas naturales de la transmisión de *T. cruzi* durante la fase de vigilancia para evaluar el impacto de rociados selectivos, con insecticidas residuales, realizados por la propia comunidad y para identificar la emergencia de nuevos casos de infección y establecer sus probables fuentes. Para este propósito monitoreamos regularmente la infestación e infección de las vinchucas en todas las viviendas conjuntamente con el registro de medidas de demografía, prevalencia e incidencia de infección en perros, antes, durante y luego de la transferencia del sistema de vigilancia a las comunidades. Además, en 2002 se incluyó el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en gatos.

2.1.2. Objetivos particulares

- Determinar la prevalencia de infestación por *T. infestans*, la abundancia del vector y la ocurrencia de infección en vectores, perros y gatos domésticos a los 4 y 6 años de la transferencia de las actividades de vigilancia vectorial y rociado selectivo a la comunidad.
- Evaluar la incidencia de infección por *T. cruzi* en perros.
- Detectar los nuevos casos de infección en perros y establecer sus probables fuentes.
- Complementar el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en gatos mediante la utilización de técnicas serológicas.

2.1.3. Hipótesis de trabajo

- Basados en resultados previos (Castañera y col., 1998), hipotetizamos que durante la fase de vigilancia los nuevos casos de infección por *T. cruzi* en perros ocurrirían en viviendas que ya albergaban perros o gatos infectados.
- Si ocurriese infección oral por la ingestión de mamíferos silvestres infectados, esperaríamos que los perros cazadores y los gatos tuvieran mayor riesgo de contraer la infección.

2.2. Materiales y métodos

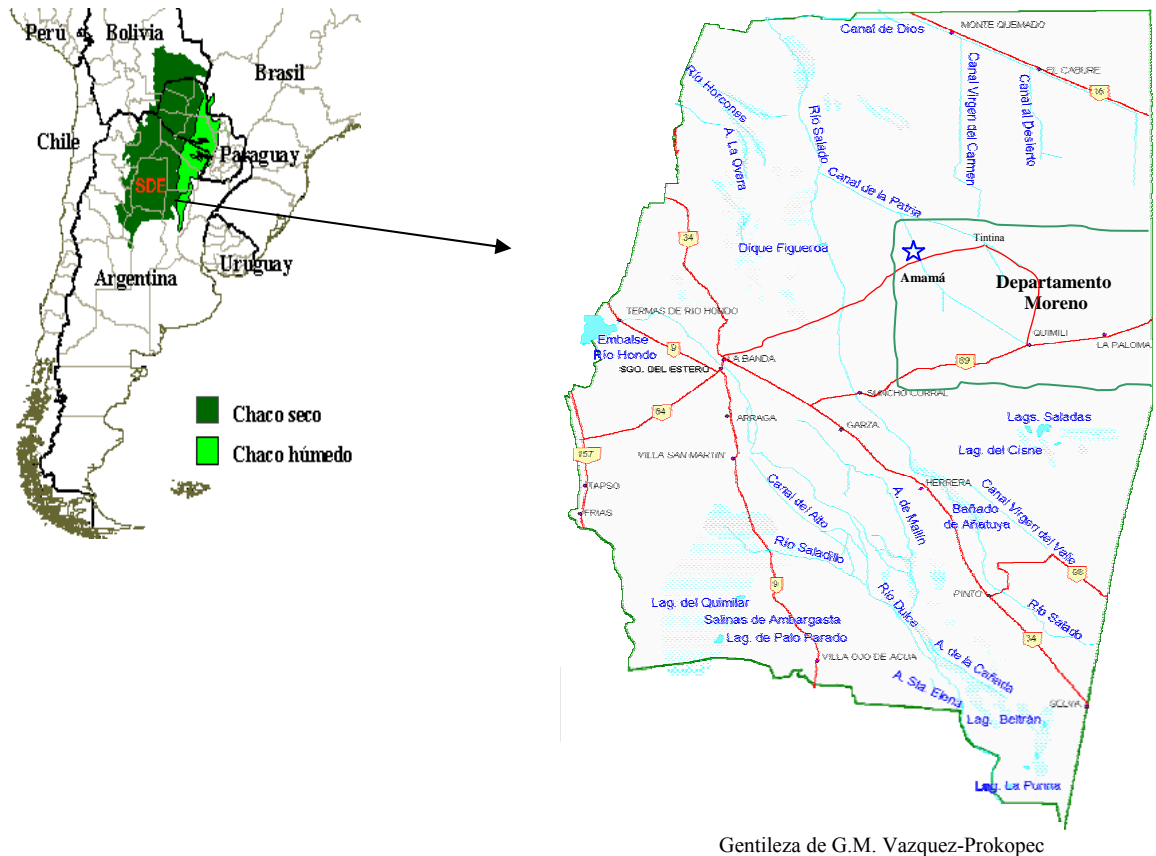
2.2.1 Área de estudio

El trabajo de campo se realizó en el pueblo de Amamá (27°12'33''S, 63°02'10''W) y en los pueblos vecinos de Trinidad, Mercedes, Pampa Pozo y Villa Matilde, en el Departamento Moreno de la provincia de Santiago del Estero, Argentina (Figura 2.1). Estas comunidades rurales están situadas en una región semi-árida de bosque espinoso de madera dura, cuya historia de infestación y de control de *T. infestans* ha sido descripta previamente (Gürtler y col., 1994; Cecere y col., 2002). Luego de la aplicación de insecticidas piretroides en toda la comunidad en 1992, se llevó a cabo vigilancia entomológica de triatominos de forma regular combinando participación comunitaria y rociados focales profesionales durante 1993-1995, y rociados selectivos realizados por los propios pobladores o los líderes comunitarios entre 1996 y 2002. Las actividades de vigilancia fueron descriptas en otros trabajos (Cecere y col., 1999, 2002). Empezando en 1996, la captura de un *T. infestans* de cualquier estadio (excepto huevos) llevaba al rociado de todas las áreas domésticas y peridomésticas de cada vivienda con una suspensión concentrada de deltametrina (K-Othrina; Agrevo, San Isidro, Argentina) o cipermetrina (Sipertrin; Chemotecnica, Cañuelas, Argentina) diluídas en agua para lograr una concentración de 25 mg o 50 mg de ingrediente activo/metro², respectivamente. Las infestaciones notificadas y las acciones de control efectuadas fueron registradas localmente por los líderes comunitarios o el agente sanitario local. Como parte de un nuevo programa de intervención, todas las viviendas fueron rociadas con insecticidas piretroides por personal del Programa Nacional de Control de Vectores (PNCV) en abril de 2004.

2.2.2 Colección de triatominos

Dos equipos de 4 personas cada uno (3 evaluadores expertos del PNCV y 1 encuestador) buscaron vinchucas en 133 (96%) viviendas habitadas en marzo del 2000 y en 129 (96%) viviendas en octubre de 2002. Los especímenes fueron colectados mediante capturas por hora-hombre. Esto consiste en la búsqueda de triatominos en todas las habitaciones de la vivienda (sitios domésticos, 1 persona), y en todos los sitios peridomésticos (2 personas) utilizando tetrametrina 0,2% (Icona, Buenos Aires) como agente desalojante durante 30 minutos por vivienda (Gürtler y col., 1994). Las estructuras peridomésticas abarcan los corrales de ovejas o cabras, de cerdos, vacas o caballos, gallineros, árboles donde las gallinas empollan, depósitos, cocinas y otros posibles refugios para los triatominos dentro del área de actividad humana. Las infestaciones fueron también monitoreadas mediante cajas sensoras ubicadas en los domicilios (revisadas cada 6 meses) y por capturas eventuales de triatominos por los propios moradores.

Figura 2.1 Ubicación de la provincia de Santiago del Estero dentro de la región del Gran Chaco y ubicación de Amamá dentro del Departamento Moreno.



Todos los triatomíneos fueron identificados a nivel de especie y estadio en un laboratorio de campo de la forma descrita por Canale y col., (2000). Todas las ninfas de tercer a quinto estadio y los adultos vivos o moribundos fueron examinados para determinar su infección por *T. cruzi* mediante la observación al microscopio óptico (220-400X) de un extendido de heces dentro de los 10 días de capturados los insectos. Los especímenes de *T. infestans* fueron examinados individualmente mientras que los de *T. guasayana* y *Triatoma garciabesi* fueron examinados en pools de 3 individuos procedentes del mismo sitio de captura. De un subgrupo de estos triatomíneos se guardó una alícuota de heces para un posterior diagnóstico de la infección mediante la amplificación de un fragmento de 330 pares de bases de la región variable del minicírculo del kinetoplasto por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.2.3 Animales domésticos

Se realizó un censo vivienda por vivienda de todos los perros en mayo del 2000 y nuevamente en octubre del 2002, incluyendo esta vez, también, a los gatos. El objetivo de estos estudios fue realizar un censo completo de las poblaciones canina y felina. Se completó un cuestionario para cada animal (Anexo 1) en ambas ocasiones. En él se preguntaba el nombre, edad, sexo y lugar de nacimiento de cada perro y gato que poseían en la vivienda. También se registraba el nombre de la madre del animal y su historia de viaje o residencia en poblados fuera del área de estudio. En el 2002 se recopiló información adicional que incluía la función principal del perro (cazador, cabrero, guardián o mascota); el lugar donde el animal usualmente dormía de noche; tipo de dieta; aspecto clínico externo (bueno, regular o malo; siguiendo los criterios de Petersen y col., 2001) y para las hembras, el número de camadas y destino final de los cachorros. El cuestionario de gatos, realizado sólo en el 2002, incluía adicionalmente la función principal del gato (cazador de roedores, serpientes o aves; y mascota), presas cazadas, y duración y frecuencia de visitas al monte.

A los perros y gatos de 3 meses de edad o mayores se les tomó una muestra de sangre mediante punción venosa, mientras que a los animales de menor edad (26 perros y 6 gatos, los cuales podrían tener anticuerpos anti- *T. cruzi* maternos) se los examinó solamente mediante xenodiagnóstico usando por animal 20 ninfas de tercer o cuarto estadio de *T. infestans* criadas en laboratorio (Gürtler y col., 1996). Seis perros seropositivos y 6 con un resultado serológico indeterminado en el 2000 fueron re-examinados por xenodiagnóstico y serología en el 2002. Para poder realizar la punción venosa de los gatos, se los capturaba con una red y eran anestesiados usando 2-5 mg/kg de clorhidrato de tiletamina y clorhidrato de zolacepam (Zelazol®, Fort Dodge Sanidad Animal, La Plata, Argentina). Las muestras de sangre fueron procesadas y preservadas como ha sido descrito anteriormente (Castañera y col., 1998). Todo el procesamiento de animales fue realizado de acuerdo al protocolo de ética N° 04223 del Comité Institucional para el Cuidado y Uso Animal de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, Estados Unidos.

2.2.4 Serodiagnóstico y xenodiagnóstico

Cada suero de perro fue examinado para anticuerpos contra *T. cruzi* mediante el ensayo de hemoaglutinación indirecta (HAI; Polychaco, Buenos Aires, Argentina), la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), y el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) usando procedimientos ya estandarizados (Lauricella y col., 1993, 1998). Cada suero de gato fue examinado para anticuerpos contra *T. cruzi* mediante HAI (Polychaco, Buenos Aires,

Argentina), IFI (antigamma total LID, Laboratorio de Inmunodiagnóstico, Buenos Aires, Argentina), y ELISA (IgG de cabra anti-gato marcada con HRP, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California). Los títulos $\geq 1:16$ (para HAI e IFI) y una absorbancia óptica $\geq 0,2$ (para ELISA) fueron usados como valores de corte; estos fueron determinados a partir de la distribución de títulos serológicos de 20 perros de campo con xenodiagnóstico positivo y 53 perros de campo con xenodiagnóstico negativo (Lauricella y col., 1998). El suero de un gato con xenodiagnóstico positivo y seropositivo por HAI e IFI fue usado como control positivo. Cada suero fue ensayado en ELISA por duplicado. Los duplicados que mostraban diferencias relativas en la absorbancia óptica mayores a 0,2 y los sueros que daban resultados discordantes entre las diferentes técnicas serológicas (i.e., los que daban positivos por una sola técnica) fueron re-ensayados, y el segundo resultado fue considerado definitivo. “Seropositivo” se refiere a muestras reactivas por al menos dos técnicas serológicas (entre ELISA, IFI y HAI) en cualquiera de las campañas. Los animales seropositivos fueron posteriormente examinados por xenodiagnóstico para confirmar la infección por *T. cruzi* y para aislar parásitos de la manera descrita previamente (Gürtler y col., 1996). Un perro seropositivo y un gato discordante por serología murieron antes de que se les pudiera practicar el xenodiagnóstico. Los insectos de los xenodiagnósticos fueron examinados a los 30 y 60 días post-ingesta. Para ello se observaron al microscopio óptico (a 400 x) pooles de heces de 5 insectos alimentados sobre el mismo individuo. En caso de resultar positivo, el pool era desarmado y los insectos re-examinados individualmente.

“Infectado” significa que el animal posee un xenodiagnóstico positivo y/o que es seropositivo para *T. cruzi*. Los resultados del serodiagnóstico y del xenodiagnóstico fueron combinados para calcular la prevalencia compuesta de infección por *T. cruzi*. Fueron considerados como nativos los animales que habían nacido y se habían criado en la vivienda así como también a aquellos que llegaron a la vivienda hasta con 3 semanas de edad. Dado que el xenodiagnóstico es 92-100% sensible en cachorros menores de un año de edad (Gürtler y col., 1996), los cachorros con ≤ 3 meses que fueron examinados sólo por xenodiagnóstico fueron considerados como seronegativos para la estimación de la incidencia de infección. Perros seronegativos y/o cachorros xeno-negativos en diciembre de 1996 o en mayo de 2000 (estudios de base) que mostraron seroconversión por 2 técnicas serológicas o que poseían un xenodiagnóstico positivo fueron considerados como casos incidentes de *T. cruzi*.

2.2.5 Análisis de datos

La edad de los perros informada por sus dueños fue chequeada contra registros de censos realizados entre 1992-2000 y corregida en caso de ser necesario. Como el recuerdo de eventos recientes es más preciso que el de los eventos distantes en el tiempo, se asumió como correcto el primer registro de la edad del perro. Las estadísticas demográficas fueron restringidas a los datos colectados en el 2002 debido a que el tamaño muestral era mayor y los datos más detallados que en el 2000.

Para evaluar la relación entre la infección por *T. cruzi* en perros nacidos post-rocido (número examinado, N = 202 en el 2000; N = 245 en el 2002) y factores de riesgo potenciales se calcularon razones de probabilidad (RP, u “odds ratios”) no ajustadas e intervalos de confianza del 95% (IC) mediante el método de Woolf en el análisis univariado (Kahn y Stempos, 1989). Las variables demográficas consideradas fueron: poblado de residencia (categorizado en 3 niveles: Amamá, Trinidad fue agrupada con Pampa Pozo y Mercedes con Villa Matilde debido a su cercanía); edad (en meses, como una variable subrogante del período de exposición); sexo; residencia local inestable (2 niveles: inmigrantes [rurales o urbanos] o nativos con historia de viaje; nativos sin historia de viaje fuera del área de estudio [i.e., perros residentes permanentes]); seropositividad para *T. cruzi* de la madre del perro (2 niveles); cohabitar con al menos un perro infectado con *T. cruzi* (2 niveles); y hábito cazador (2 niveles). Se tomaron como niveles de referencia Trinidad-Pampa Pozo, el menor grupo de edad, machos, nativos sin historia de viaje, tener una madre seronegativa, no cohabitar con un perro infectado, y no tener hábito cazador, respectivamente. Las variables entomológicas se derivaron de las capturas por hora-hombre, sensores domiciliarios (Biosensor detector de vinchucas, Biocientífica de Avanzada®, Buenos Aires) y colecciones de los moradores realizadas en la vivienda de cada perro aproximadamente cada 6 meses entre octubre de 1993 y octubre del 2000 y en octubre del 2002 e incluyeron: ocurrencia de ejemplares de *T. infestans* infectados por *T. cruzi* a lo largo de la vida del perro (2 niveles); abundancia acumulada (categorizada en 3 niveles), y el número máximo de *T. infestans* capturados a lo largo de la vida del perro, en 2 estratos separados (áreas domésticas y sitios peridomésticos cercanos [cocinas, hornos y depósitos]); y ocurrencia de *T. guasayana* o *T. garciabesi* en áreas domésticas o peridomésticas en la vivienda del perro entre el 2000 y el 2002 (2 niveles). Las razones de probabilidad ajustadas y sus IC fueron estimados mediante un análisis de regresión logística múltiple con un algoritmo de máxima verosimilitud (Stata 9.0, College Station, TX). Los análisis de regresión fueron anidados por la vivienda de los perros para proveer errores estándares robustos. Sólo las variables significativas al 10% de significancia en el análisis univariado fueron incluídas en el análisis de regresión logística múltiple. Se

usaron procedimientos, paso a paso regresivos y progresivos para obtener el modelo más parsimonioso que retuviese las variables independientes a un nivel de significancia del 5%. Los términos de interacción fueron añadidos a este modelo y descartados si no resultaban significativos. La prueba de Wald examina la hipótesis de que todos los coeficientes de regresión sean iguales a 0.

Para computar la prevalencia y la incidencia de *T. cruzi*, se supuso que 8 perros seronegativos y 5 perros seropositivos en 2002 que habían tenido la misma seroreactividad en 1994 o en 1996 estaban en el mismo estado en el 2000, año en el que no fueron examinados. Además, 3 perros seropositivos en 1994-1996 fueron considerados seropositivos en el 2000 a pesar de no haber sido examinados. La tasa instantánea de conversión de negativo a positivo per capita (fuerza anual de infección, λ) fue estimada retrospectivamente a partir de los datos de prevalencia específica por edad de los perros usando un modelo catalítico con una tasa de recuperación nula (Muench, 1959), reflejando de este modo la ausencia de serorecuperación o de quimioterapia específica. Este modelo asume que la incidencia de infección es constante a lo largo del tiempo e independiente de la edad; los individuos hospedadores están homogéneamente expuestos; no existe una ventana de tiempo entre la infección y la infectividad, y la asociación entre la edad y la prevalencia es observada en el equilibrio. λ fue estimada usando cuadrados mínimos no lineales (Matlab 6.3, The MathWorks, Natick, MA) y el modelo catalítico $p_a = 1 - \exp(-\lambda \cdot a)$, donde p_a es la proporción de individuos infectados dentro de la clase de edad cuyo punto medio es a . Este modelo fue usado como hipótesis nula para examinar si los picos en la curva de prevalencia por edad se desviaban significativamente del intervalo de confianza del 95% para λ .

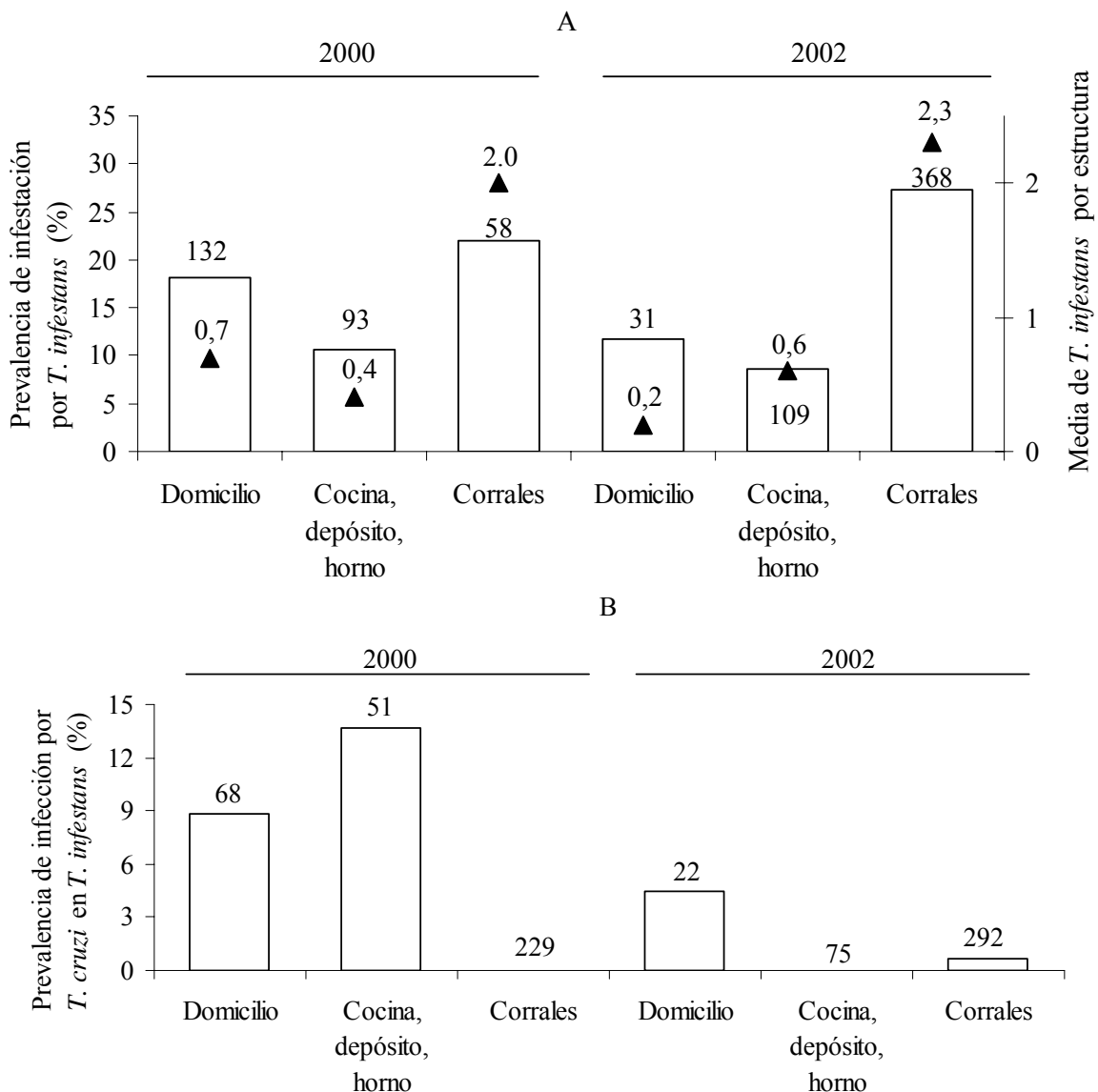
2.3. Resultados

2.3.1 Infestación por triatominos

La prevalencia de infestación por *T. infestans* varió desde un 12-18% en los sitios domésticos, 9-11% en cocinas y sitios peridomésticos cercanos, al 22-27% en corrales en los años 2000 y 2002 (Figura 2.2A). La abundancia media de *T. infestans* aumentó con la prevalencia de infestación, desde 0,2-0,7 insectos por 0,5 hora-hombre por vivienda en sitios domésticos o sitios peridomésticos cercanos a 2,0-2,3 insectos por 0,5 hora-hombre en corrales. La prevalencia de *T. infestans* infectados con *T. cruzi* en sitios domésticos (4,5-8,8%) fue menos variable que en sitios peridomésticos cercanos (0-13,7%) (Figura 2.2B). En los corrales raramente se hallaron *T. infestans* infectadas (0-0,7%). La prevalencia de infección total para

T. infestans en todos los sitios peridomésticos fue 2,5% en el 2000 y 0,7% en el 2002; para *T. garciabesi* fue 0% (número examinado, N = 85) y 0% (N = 24); y para *T. guasayana* fue 0% (N = 32) y 0% (N= 132), respectivamente. Se detectó ADN de *T. cruzi* en el 91% de las *T. infestans* positivas al microscopio y en sólo el 3,4% de las negativas al microscopio, pero no se lo detectó en ninguna de las otras especies de triatomos colectadas (Marcet y col., 2006; Schijman y col., 2006).

Figura 2.2. A, Prevalencia (barras) y abundancia (triángulos) de infestación por *Triatoma infestans* y B, prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en *T. infestans* de sitios domésticos y peridomésticos en Amamá y poblados vecinos, Argentina, marzo 2000 y octubre 2002. Los números por encima de las barras indican los triatomos colectados (A) o examinados para infección (B).



2.3.2 Demografía de las poblaciones de perros y gatos

Un total de 218 (71%) de 309 perros registrados en el 2000, y 257 (84%) de 306 perros y 48 (86%) de 56 gatos registrados en el 2002 fueron examinados para determinar su infección por *T. cruzi*. La población canina en el 2000 y en el 2002 prácticamente tenía el mismo tamaño (306-309 perros), la misma edad mediana (2,6-2,7 años) y la misma razón de sexos (79-82% de machos). En el 2002, los perros eran 5 veces más abundantes que los gatos, y la mayoría eran perros mestizos (Tabla 2.1). La razón de sexos estaba significativamente sesgada hacia los machos en los perros ($\chi^2 = 125,5$; grados de libertad [gl] = 1; $P < 0,001$) y en los gatos ($\chi^2 = 7,4$; gl = 1; $P < 0,01$). De las 119 viviendas visitadas, el 91% poseía al menos un perro y el 37% al menos un gato. La edad mediana de la población canina era 3,0 años y las edades se distribuían en 22% < 1 año; 29% 1-2 años; 27% 3-5 años, y 22% > 5 años de edad. La edad mediana de la población de gatos era de 2,0 años y las edades se distribuían en 18% < 1 año; 37% 1-2 años; 23% 3-5 años, y 22% > 5 años de edad. Los gatos habían nacido localmente (82%) con igual frecuencia que los perros (73%) (Prueba de Fisher; $P = 0,18$). La mayoría de los perros y gatos se hallaban sueltos. Un tercio de los perros se usaba para cazar y el 10 % comía presas de caza. Más de la mitad de los gatos se escapaban al monte (56%) y habitualmente cazaban roedores, aves y víboras (54%) según sus dueños.

Tabla 2.1 Parámetros demográficos y prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* en perros y gatos de Amamá y poblados vecinos, Argentina, Noviembre 2002.

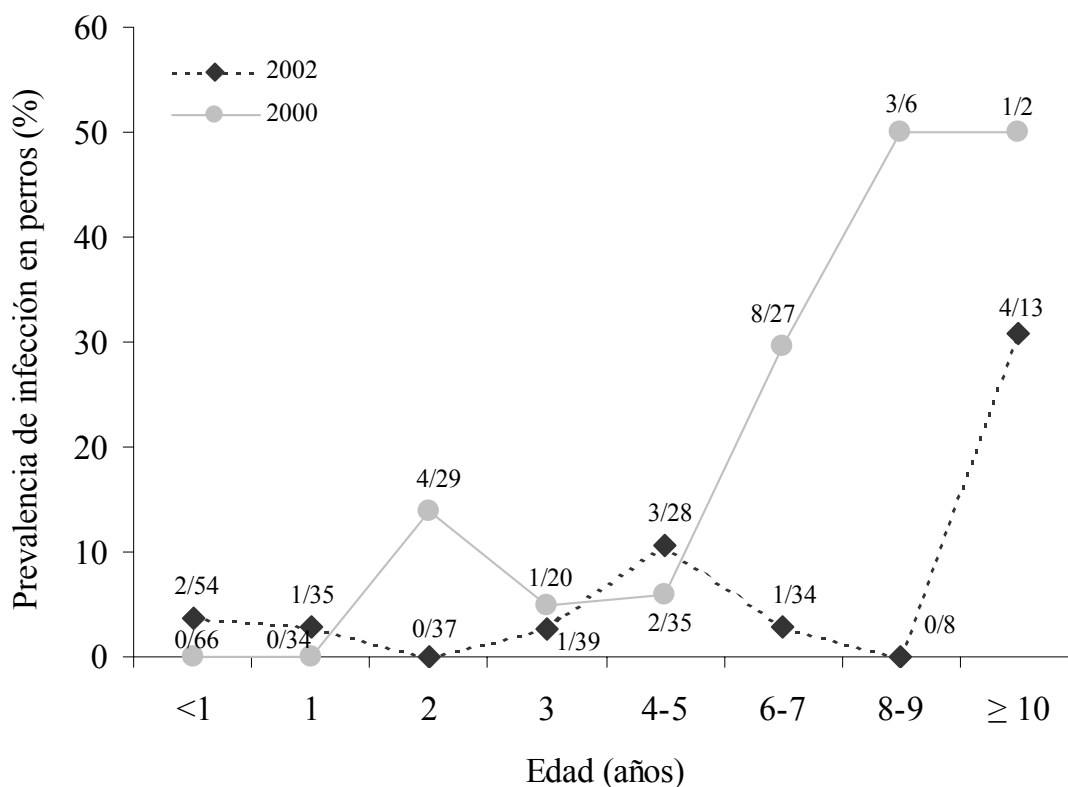
Hospedador	Media por vivienda (rango)	Edad mediana (primer-tercer cuartil)	% machos	% nativos (N)*	% (N) positivos por			Prevalencia compuesta de infección (N)
					Sero-diagnóstico solamente	Xeno-diagnóstico solamente	Ambos	
				73			34,5	
Perros	2,4 (0-8)	3,0 (1-5)	82	(306)	0,5 (202)	3,8 (26)	(29)	4,7 (257)
				82				
Gatos	0,4 (0-3)	2,0 (1-5)	67	(56)	2,4 (41)	0 (6)	0 (1)	2,1 (48)

* N, número registrado o examinado.

2.3.3 Infección por *T. cruzi* en perros

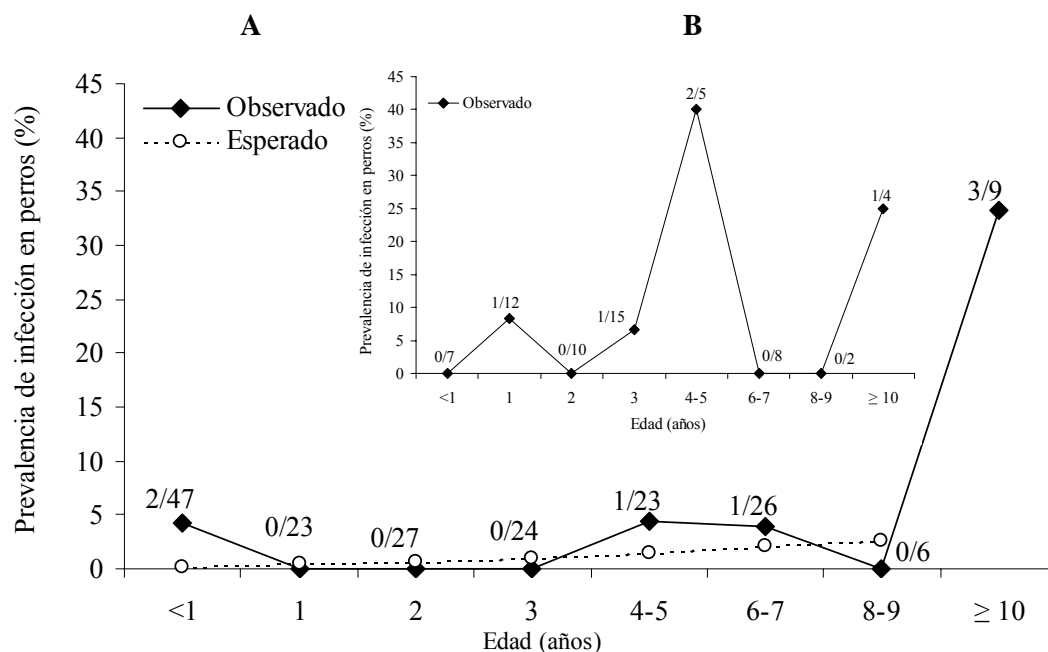
La prevalencia compuesta de infección por *T. cruzi* en todos los perros en el 2000 (8,7%; N = 218) fue significativamente menor (Prueba de Fisher; $P = 0,04$) que la de 1996 (15,0%; N = 237), y fue levemente mayor que la de 2002 (4,7%; N = 257) pero no significativamente (Prueba de Fisher; $P = 0,09$). La curva de prevalencia por edad de todos los perros en el 2000 mostró un pico pequeño a los 2 años de edad (14%) y un pico mayor para los perros > 6 años (27-33%), y se mantuvo entre 0-5% en los demás grupos de edades (Figura 2.3). El pico pequeño se debió a 4 perros seropositivos, 3 de los cuales tenían residencia permanente y ningún resultado serológico previo. Dos de estos últimos habían nacido de madres seropositivas y el restante de una madre seronegativa. En el 2002, la prevalencia aumentó abruptamente desde < 4% en perros ≤ 3 años hasta 11% en perros de 4-5 años de edad, para luego descender a < 3% en perros de 6-9 años de edad y luego repuntar a 31% en perros mayores a 10 años (i.e., aquellos que estaban presentes antes de la campaña de rociado comunitario en 1992) (Figura 2.3).

Figura 2.3. Prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* por edad para todos los perros (nativos e inmigrantes) de Amamá y poblados vecinos, Argentina, mayo 2000 y noviembre 2002. Las fracciones indican el número de perros infectados sobre los examinados. Esta figura excluye nueve perros con edad desconocida en el 2002.



En 2002, la curva de prevalencia por edad de perros nativos fue plana (rango, 0-4 %) en perros ≤ 9 años de edad y luego aumentó abruptamente al 33% en los pocos perros $>$ de 10 años existentes (Figura 2.4A). La prevalencia de infección registrada para los perros nativos de 4-5 años de edad (4,3%) fue significativamente mayor que la predicha por el modelo catalítico (1,5%), lo que es indicativo de que durante ese periodo actuó una fuerza de infección en promedio mayor. La prevalencia de *T. cruzi* en perros inmigrantes (7,9%; N = 63) fue aproximadamente el doble que la de los perros nativos (3,8%; N = 185) y presentó un pico a los 4-5 años de edad (Figura 2.4B). Para los perros nacidos post-rociado ($<$ 10 años de edad), la fuerza anual promedio de infección fue de 0,28 por cada 100 años-perro para los nativos (IC = 0,00-0,72%); 1,41% para los inmigrantes, y 0,39% para todos los perros.

Figura 2.4. Prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* por edad observada (línea sólida) y esperada (guiones, según un modelo catalítico) para 248 perros de Amamá y poblados vecinos en noviembre 2002. A, Perros nativos. B, Perros inmigrantes. Las fracciones indican el número de perros infectados sobre los examinados. Esta figura excluye nueve perros con edad desconocida.



2.3.4 Infección por *T. cruzi* en gatos

Los gatos tuvieron una prevalencia de *T. cruzi* (2,1%) similar a la de los perros (4,7%) en el 2002 (Prueba de Fisher; $P = 0,70$) (Tabla 2.1). Para los gatos de Trinidad y Mercedes, la

prevalencia de infección en el 2002 (6,7%) fue significativamente menor (Prueba de Fisher; $P = 0,03$) que la registrada en el estudio de base en 1992 (39,3%) (Gürtler y col., 1993). El único gato seropositivo para *T. cruzi* (ELISA: 0,244 e IFI 1: 64) y xenodiagnóstico-negativo era un gato de 5 años de edad, nativo sin historia de viaje fuera del área de estudio, y que habitaba en una vivienda donde se hallaron *T. infestans* infectados en el domicilio en 2002. Un gato con serodiagnóstico discordante (ELISA $\geq 0,25$ y HAI e IFI ≤ 1 : 8) murió antes de poder practicarle un xenodiagnóstico.

2.3.5 Comparación entre técnicas serológicas

Los títulos serológicos de los perros mostraron una clara distinción entre los sueros reactivos y los no reactivos para *T. cruzi*, con concordancia prácticamente perfecta entre ELISA e IFI en el 2000-2002 (Figura 2.5). Un total de 410 sueros con valores de absorbancia por ELISA $< 0,15$ y títulos por IFI ≤ 1 : 8 fueron claramente negativos, mientras que 22 sueros con ELISA $\geq 0,25$ e IFI ≥ 1 : 64 fueron claramente positivos (Figura 2.5). Todos los 8 perros seropositivos examinados en diciembre del 2000 fueron positivos por xenodiagnóstico, y 10 de los 11 perros y gatos examinados en marzo o julio del 2003 fueron positivos por xenodiagnóstico. La concordancia entre el xenodiagnóstico y el serodiagnóstico en perros fue del 85% (35/41) (Tabla 2.2). La técnica de ELISA detectó a todos los perros con xenodiagnósticos positivos, mientras que las de IFI y HAI perdieron un perro seropositivo con xenodiagnóstico positivo cada una, aunque no el mismo individuo. Un perro de 5 años de edad en el 2002 fue simultáneamente positivo por las tres técnicas serológicas y negativo por xenodiagnóstico en 3 ocasiones entre el 2000 y el 2003.

2.3.6 Distribución de la infección por *T. cruzi* en animales domésticos

Los 12 perros infectados detectados en el 2002 se encontraban en 9 (7,6%) viviendas; una de ellas (A-109) albergaba 4 perros infectados. Cuatro de los 12 perros infectados eran inmigrantes, y otros 4 habían sido registrados o detectados infectados en el censo de 1992 cuando existía intensa transmisión doméstica. Los restantes 4 perros tenían residencia permanente en el área de estudio; todos habían nacido en la vivienda A-109 de 2 madres emparentadas seropositivas para *T. cruzi*. Dos de estos perros ya eran positivos serológicamente y por xenodiagnóstico en 1996 o en el 2000 y los otros 2 eran cachorros de 5 meses de edad de la misma camada nacidos de una madre con xenodiagnóstico positivo. La vivienda A-109 había estado fuertemente infestada con *T. infestans* infectados en sitios domésticos y peridomésticos cercanos en el 2000, y en consecuencia fue rociada

inmediatamente con insecticidas. En el 2002, cuando nacieron los cachorros, no se hallaron *T. infestans* en el domicilio ni en los sitios peridomésticos cercanos.

Figura 2.5. Distribución de frecuencias de los valores de absorbancia para la técnica de ELISA y de títulos para la técnica de IFI en perros de Amamá y poblados vecinos. A, Mayo 2000. B, Noviembre 2002.

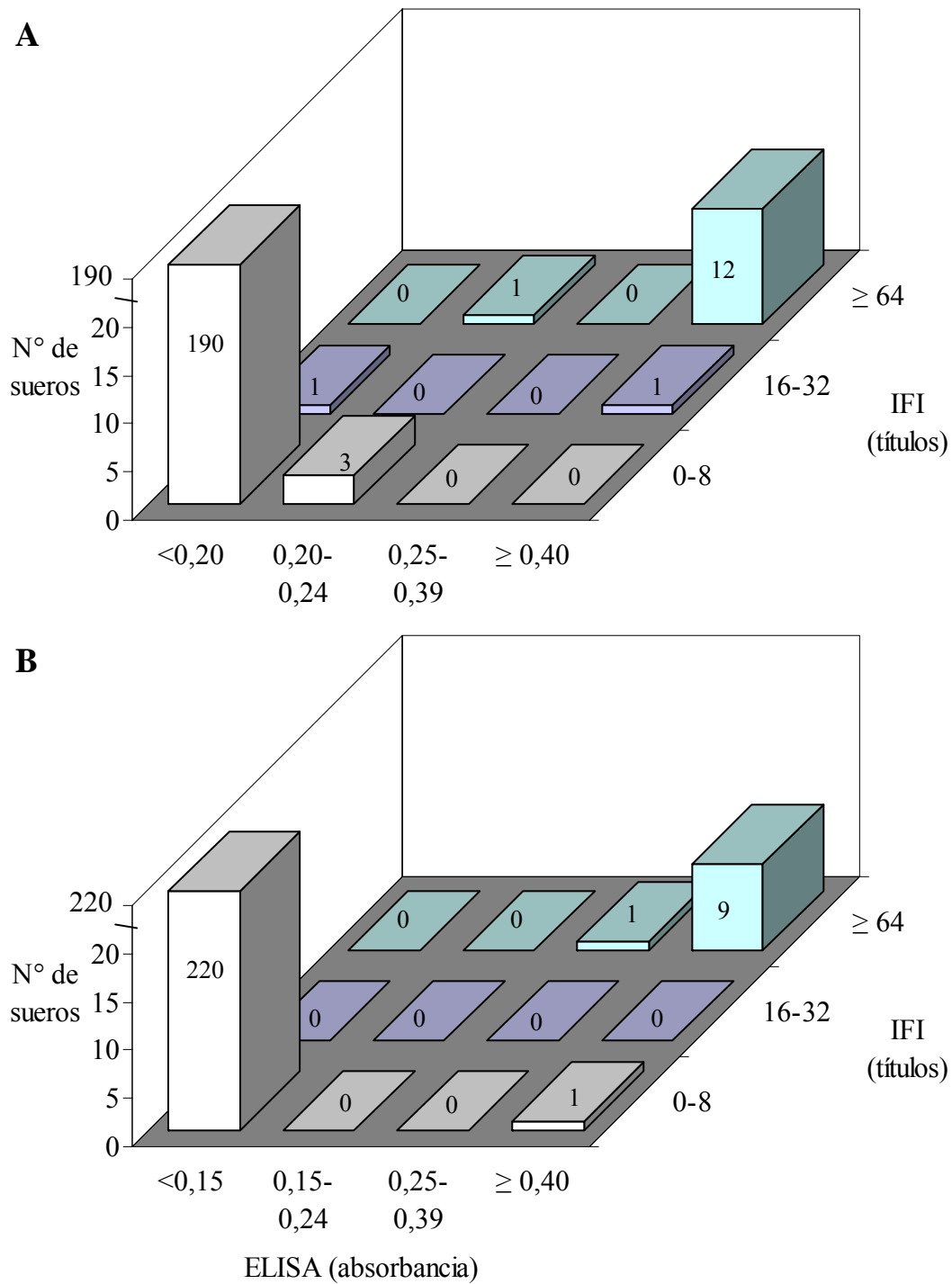


Tabla 2.2. Comparación de los resultados obtenidos por serología y xenodiagnóstico en perros de Amamá y poblados vecinos, Argentina, 2000-2002.

Xenodiagnóstico	Nº examinado	Seroreactividad a ELISA, IFI, HAI, respectivamente				
		+, +, +	+, +, -	+, -, +	-, +, +	-, -, -
Positivo	16*	14	1	1	0	0
Negativo	25	5†	1	0	0	19
Total	41	19	2	1	0	19

* Excluye un cachorro de 5 meses de edad con xenodiagnóstico positivo que no fue examinado por serología.

† Incluye un perro con xenodiagnóstico negativo en el 2002 pero que había tenido un xenodiagnóstico positivo en el 2000.

2.3.7 Infección por *T. cruzi* y factores de riesgo potenciales

La relación entre la prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros nacidos post-rociado y los factores de riesgo potenciales se muestra en la Tabla 2.3. En el análisis univariado, la infección por *T. cruzi* fue significativamente mayor para los perros con madre seropositiva para *T. cruzi*, y se asoció positiva y significativamente al número de *T. infestans* domésticos colectados en la vivienda del perro a lo largo de su vida tanto en el 2000 como en el 2002. La prevalencia de infección aumentó significativamente con la edad y con la ocurrencia de *T. infestans* infectadas en la vivienda del perro para el 2000 pero no para el 2002. En el 2002, la infección fue significativamente mayor en los perros con residencia inestable en los pueblos del área de estudio. Esta variable combina el hallazgo de que los perros inmigrantes rurales tenían 4 veces más prevalencia de infección (10,7%; N = 28; razón de probabilidades; RP = 4,2; IC 95% = 1,0-18,9) que los inmigrantes urbanos o los perros nativos (2,7%; N = 37 y N = 182; respectivamente), mientras que los pocos perros que habían viajado fuera del área de estudio (mayormente visitas largas a otras áreas rurales por más de 2 semanas) tenían 4,6 veces mayor prevalencia (14,3%; N = 14) que los perros sin historia de viaje (3,1%; N = 201). La infección en los perros no estuvo significativamente asociada al pueblo de residencia; sexo; ser un perro cazador; número acumulado de *T. infestans* colectado en cocinas, hornos y depósitos de la vivienda del perro a lo largo de su vida, o con la captura de *T. guasayana* o *T. garciabesi* en la vivienda del perro (datos no mostrados). El análisis de regresión logística múltiple de los datos agrupados por vivienda confirmó los resultados del

Tabla 2.3 Prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* y factores de riesgo potenciales en perros nacidos post-rociado en Amamá y poblados vecinos, Argentina, mayo 2000 (N = 202) y noviembre 2002 (N = 245).

Factor	2000*			2002*		
	% infectado (N)	Razones de probabilidad no ajustadas (IC 95%)	Razones de probabilidad ajustadas (IC 95%)	% infectado (N)	Razones de probabilidad no ajustadas (IC 95%)	Razones de probabilidad ajustadas (IC 95%)
Edad (en meses)	- (202)	1,0 (1,01-1,07) [§]	1,0 (1,02-1,07) [§]	- (236)	0,98 (0,96-1,00)	1,0 (0,97-1,01)
Poblado de residencia						
Trinidad-						
Pampa Pozo	2,0 (50)	1	-	1,7 (58)	1	-
Mercedes-Villa						
Matilde	2,2 (45)	1,1 (0,1-18,3)	-	5,8 (52)	3,5 (0,4-34,6)	-
Amamá	8,4 (107)	4,5 (0,6-36,5)	-	3,0 (135)	1,7 (0,2-15,9)	-
Residencia inestable en el área de estudio [†]						
No	5,1 (176)	1	-	1,9 (210)	1	1
Si	10,5 (19)	2,2 (0,4-10,9)	-	11,4 (35)	6,6 (1,6-27,9) [§]	12,5 (2,4-65,9) [§]
Seropositividad a <i>Trypanosoma cruzi</i> de la madre del perro						
No	2,7 (73)	1	-	0,0 (80)	1	-
Si	21,7 (23)	9,9 (1,8-55,0) [§]	-	26,7 (15)	62,2 (3,1-1232,9) [§]	-
Sin datos	3,8 (106)	-	-	2,7 (150)	-	-
Nº de <i>Triatoma infestans</i> domésticas capturadas a lo largo de la vida el perro [‡]						
0	3,7 (135)	1	-	2,5 (160)	1	-
1-9	5,4 (56)	1,5 (0,3-6,4)	-	2,7 (74)	1,1 (0,2-6,1)	-
≥ 10	33,3 (9)	13,0 (2,5-67,6) [§]	1,1 (1,1-1,2) [§]	22,2 (9)	11,1 (1,7-71,5) [§]	1,1 (1,0-1,2) [§]
<i>Triatoma infestans</i> infectados capturados en la vivienda del perro en el 2000 o en el 2002 [‡]						
No	3,8 (185)	1	-	2,7 (226)	1	-
Si	26,7 (15)	9,2 (2,3-36,4) [§]	-	11,8 (17)	4,9 (0,9-26,3)	-

* Excluye 29 perros nacidos antes del rociado masivo con insecticidas.

[†] Siete perros seronegativos sin información acerca de su residencia fueron excluidos.

[‡] Dos perros cuyas casas no poseían datos entomológicos fueron excluidos solamente para estas variables.

[§] Significativo al nivel de 0,05.

análisis univariado. Para los perros del 2000 y del 2002, la infección ajustada por la edad estuvo asociada positiva y significativamente con el número máximo (31-42 insectos por 0,5 hora-hombre) de *T. infestans* domésticos capturado en la vivienda del perro a lo largo de su vida (Tabla 2.3). En el 2000, la infección en los perros también estuvo asociada positivamente con la edad (Wald $\chi^2 = 40,7$; 2 gl; $P < 0,0001$), mientras que en el 2002 la infección de los perros estuvo asociada positivamente con la residencia local inestable (Wald $\chi^2 = 26,4$; 2 gl; $P < 0,0001$). La variable de seropositividad de la madre no pudo ser evaluada en el análisis de regresión logística múltiple debido a que los 80 perros con madre seronegativa eran seronegativos para *T. cruzi*.

2.3.8 Incidencia de infección por *T. cruzi* en perros

Entre 1996 y 2000, sólo un caso incidente fue detectado por seroconversión entre 133 perros seronegativos, lo que resulta en 0,26 casos por 100 años-perro (Tabla 2.4). En este periodo, el 86% de todos los perros seronegativos en el estudio de base estuvo expuesto al menos una vez a *T. infestans* en domicilios o sitios peridomésticos cercanos. Un caso incidente fue detectado entre 59 perros que habían resultado seronegativos en el estudio de base y que fueron re-examinados 3,5 años después. Este caso incidente era un perro de 3 años de edad, con residencia permanente que habitó en una vivienda con *T. infestans* infectados con *T. cruzi*. Para las casas infestadas con perros candidatos, la captura total mediana de *T. infestans* en domicilios y en sitios peridomésticos cercanos decreció desde 6 ejemplares (primer y tercer cuartil Q1 y Q3 = 3 y 17; rango = 1-77) en 1996-2000 a 3 ejemplares (Q1 y Q3 = 2 y 8; rango = 1-56) en el 2000-2002. Entre el 2000 y el 2002 ninguno de los 74 perros seroconvirtió, a pesar de que el 51% de ellos estuvo expuesto a *T. infestans* en domicilios y en sitios peridomésticos cercanos durante los 2,5 años previos. El único perro discordante serológicamente y con xenodiagnóstico negativo en el 2000 fue seronegativo por las 3 técnicas y tuvo xenodiagnóstico negativo en el 2002.

Tabla 2.4 Incidencia de infección por *Trypanosoma cruzi* entre perros con o sin exposición a la infestación por *Triatoma infestans* en los domicilios o en los sitios peridomésticos cercanos (cocinas, hornos o depósitos) de sus respectivas viviendas durante el seguimiento, Amamá y poblados vecinos, Argentina, 1996-2000 y 2000-2002.

Periodo de estudio	Infestación	No. de perros		No. de años-perro de exposición	No. de casos incidentes (%)	Densidad de incidencia por 100 años-perro
		seronegativos en el estudio de base que fueron re-examinados				
1996-2000	Si	51		178,5	1 (2,0)	0,65
	No	8		28,0	0	0
2000-2002	Si	38		95,0	0	0
	No	36		90,0	0	0
Total		133		392,0	1 (0,7)	0,26

2.4 Discusión

2.4.1 Efectos de la vigilancia sostenida sobre la transmisión de *T. cruzi*

Nuestro estudio demuestra una marcada declinación a largo plazo de la prevalencia y la incidencia de infección en perros y gatos como resultado de la aplicación masiva de insecticidas seguida por vigilancia vectorial con participación comunitaria sostenida en el tiempo. Llamativamente, la prevalencia de infección en perros fue reducida a niveles similarmente bajos en los 3 grupos de poblados. Basándonos en las curvas de prevalencia por edad, la fuerza anual de infección de *T. cruzi* en perros cayó 260 veces desde 72,7% en 1992 (Gürtler y col., 2005) al 0,26-0,28%; determinada prospectivamente entre 1996-2002 o retrospectivamente en 2002 para perros nativos nacidos post-rociado. A modo de comparación, para los niños de Amamá la fuerza anual de infección promedio estimada prospectivamente fue del 4,3% cuando la reinfestación doméstica repuntó en 1992 (Gürtler y col., 2005).

2.4.2 Prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros

La prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros mostró una sostenida declinación desde el 65% en 1992 al 15% a los 4 años posteriores al rociado masivo con insecticidas residuales, momento en el que no se registró ningún caso incidente en perros (Castañera y col., 1998) y la abundancia de *T. infestans* infectados era muy baja (Cecere y col., 1999, 2002). Durante el extenso seguimiento realizado, la población canina exhibió fluctuaciones menores en tamaño, razón de sexo o estructura etaria (Castañera y col., 1998; Castañera, 1999). Sin embargo, las tasas de inmigración de cachorros fueron altamente variables entre años (Castañera, 1999). Durante 1996, el sistema de vigilancia fue transferido a la comunidad y los moradores realizaron las acciones de control vectorial por ellos mismos, lo que llevó a que usualmente los esfuerzos se concentrasen en el domicilio. Cuando las infestaciones domésticas aumentaron hacia fines de 1997 aunque con niveles relativamente bajos, fueron extinguidas por rociados que se realizaron a lo largo de un año. A pesar de ello dejaron una impronta en la curva de prevalencia por edad registrada en el 2000, cuando se detectaron 4 casos autóctonos sin historia de viaje. Estos perros incluyeron al menos un perro incidente y un caso prevalente compatible con transmisión vectorial y no con transmisión congénita. La prevalencia de infección registrada en perros nativos de 4-5 años de edad en el 2002 se desvió significativamente de la esperada, indicando que durante ese periodo actuó una fuerza de infección en promedio mayor. Entre 1998 y 2002, las infestaciones persistieron a niveles relativamente bajos en los sitios peridomésticos (Ceballos y col., 2005) y el hallazgo de triatomíneos infectados fue raro (Gürtler y col., 2007b). La ausencia de seroconversiones en perros entre 2000 y 2002 demuestra la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* en presencia de infestaciones leves, mayormente peridomésticas. Concluimos que: (i) en presencia de persistentes infestaciones peridomésticas, la relajación del sistema de vigilancia vectorial llevó a la recolonización doméstica y a la renovación de la transmisión focal de *T. cruzi*, y (ii) la declinación sostenida en la prevalencia y la baja incidencia de infección en perros durante 1996-2002 fue el resultado conjunto de las acciones de control vectorial selectivas realizadas por la comunidad (las que mantuvieron la abundancia de *T. infestans* infectadas a niveles marginales), la rápida tasa de recambio poblacional de los perros (del 25% anual en promedio), y la baja tasa de inmigración de perros desde poblados vecinos con transmisión activa.

2.4.3 *T. infestans* y la transmisión vectorial

El rol de las estructuras domésticas y peridomésticas en la transmisión de *T. cruzi* en la fase de vigilancia no fue homogéneo. La transmisión clásicamente ha sido, y sigue siendo,

más intensa en las áreas domésticas colonizadas por *T. infestans*. Ejemplares infectados de esta especie también pueden hallarse en cocinas y depósitos, lugares de descanso para perros y gatos; mientras que son consistentemente raros en las demás estructuras peridomésticas que albergan cabras, ovejas, cerdos y aves. La fuerte asociación recurrente entre la presencia de un perro o un gato infectado y el hallazgo de *T. infestans* infectados en la vivienda se explica por el contacto frecuente entre vector-hospedador en el domicilio y la alta infectividad al vector de estos hospedadores (Gürtler y col., 1996, 2005). Aunque *T. guasayana* había sido hallada significativamente asociada a la infección por *T. cruzi* en perros entre 1994-1996 (Castañera y col., 1998), nuestros datos no muestran que sea un vector secundario putativo en el contexto epidemiológico actual.

En el presente análisis de factores de riesgo, la infección en los perros estuvo significativamente asociada al número máximo o acumulado de *T. infestans* domésticos colectados en la casa del perro a lo largo de su vida. En las viviendas con casos autóctonos compatibles con transmisión vectorial, las densidades acumuladas de *T. infestans* infectados con *T. cruzi* domésticos o de sitios peridomésticos cercanos eran claramente marginales (≤ 1 vinchuca infectada por 0,5 hora-hombre) con respecto a los niveles de pre-rociado en 1992. La abundancia total de vinchucas en estas viviendas osciló entre 0-13 vinchucas domésticas por 0,5 hora-hombre, pero sin embargo llevaron a nuevas infecciones al menos en dos perros y un gato. Sacando provecho de la extensa base de datos entomológica disponible, en este trabajo se muestra por primera vez la asociación significativa entre la infección de perros y gatos con la abundancia pasada de *T. infestans* en cada vivienda en el periodo relevante de exposición individual para cada perro o gato. Estos resultados combinados con los de un estudio prospectivo de la población local de niños sugieren que el valor umbral de abundancia de *T. infestans* por debajo del cual la transmisión de *T. cruzi* no es probable, es muy bajo (si es que existe este valor umbral) y sufre de múltiples fuentes de incertidumbre (Gürtler y col., 2005). La interrupción de la transmisión doméstica de *T. cruzi* en áreas altamente endémicas requiere de tolerancia CERO a las infestaciones leves por triatominos.

2.4.4 Distribución de la infección por *T. cruzi*

La agregación de los casos de infección por *T. cruzi* al nivel de la vivienda, también detectado en humanos (Mott y col., 1976; Williams-Blangero y col., 1997), se reflejó en el hecho de que sólo una vivienda albergara 4 de los 12 perros infectados detectados. Esta agregación podría haber sido el producto de: (i) transmisión vectorial potenciada por la co-ocurrencia de perros o gatos infectados en la misma vivienda, los cuales actuarían como

fuentes de *T. cruzi*; (ii) transmisión vertical, si las madres infectadas cohabitasen con sus descendientes; y (iii) transmisión horizontal de perro a perro, aunque esto fue sólo observado en perros experimentalmente inoculados con altas dosis de parásitos (Marsden, 1997). Tanto la transmisión vectorial como la vertical (ya detectadas en perros de campo por Salvador Mazza, 1934) aparentemente sucederían en nuestra área de estudio. La ocurrencia de dos hermanos de camada infectados con *T. cruzi*, nacidos en junio del 2002 de una madre infectada probablemente se debió a una transmisión vertical, ya que no se colectaron triatomíneos en el domicilio ni en los sitios peridomésticos cercanos de la casa donde nacieron los cachorros. En esta vivienda, los tres adultos de *T. infestans* colectados en octubre del 2002 en corrales no se hallaban infectados con *T. cruzi*. Sólo estos dos cachorros califican como casos autóctonos para el periodo 2000-2002, y evidencian claramente que la transmisión de *T. cruzi* siguió ocurriendo aún luego de 10 años de acciones de control vectorial regulares. La futura caracterización molecular de los aislados obtenidos de la madre y los cachorros servirá para establecer si estos casos se originaron de transmisión vertical.

2.4.5 Efectos de la residencia local estable

En perros nativos, la prevalencia de *T. cruzi* fue marcadamente superior sólo en los perros ≥ 10 años de edad, lo cual es consistente con las elevadas infestaciones observadas antes del rociado masivo con insecticidas residuales en 1992. Por el contrario, los perros domésticos que provenían de poblados vecinos tenían un riesgo significativamente mayor de estar infectados por *T. cruzi* que los perros nativos o los perros inmigrantes urbanos, (presumiblemente con menos o sin exposición a *T. infestans* infectados), tal como se observó en la fase de temprana de la vigilancia (Castañera y col., 1998). Las acciones de control vectorial en los poblados rurales vecinos consistieron mayormente en rociados con insecticidas realizados por pulsos, promovidos por los servicios de control vectorial y que fueron ejecutados esporádicamente por los propios pobladores desde 1994 y sin supervisión externa (Spillmann C, datos no publicados). Estas comunidades experimentaron mayores infestaciones domésticas y rociados con insecticidas menos frecuentes que las comunidades del área de Amamá. Incluso en ellos se notificaron algunos casos locales de Chagas agudo en niños (Zaidemberg y col., 2004).

La falta de contigüidad o continuidad espacial de las acciones de control vectorial dentro de una comunidad y entre grupo de comunidades ha sido señalada como la responsable de la reinfestación en distintas escalas ya que los sitios no tratados constituyen focos de dispersión de triatomíneos (Cecere y col., 2004, 2006; Vazquez-Prokopec, 2007; Zaidemberg y

col., 2004). Esta falta de contigüidad de las acciones de control también tiene su impacto sobre el control de la transmisión de *T. cruzi*. En el presente trabajo un tercio de los perros infectados eran inmigrantes, lo que evidencia que la existencia de comunidades con transmisión activa de *T. cruzi* en las cercanías de comunidades bajo vigilancia entomológica efectiva y con transmisión deprimida constituye un riesgo permanente del ingreso de hospedadores infectados y altamente infecciosos como los perros.

2.4.6 Transmisión del *T. cruzi* por la vía oral

Debido a sus hábitos cazadores, tanto los perros domésticos como los gatos podrían adquirir la infección por *T. cruzi* por la vía oral al ingerir mamíferos o triatomíneos infectados (Minter, 1976; Barr y col., 1991; Montenegro y col., 2002). Los gatos y perros del lugar típicamente vagabundean por el monte y es frecuente que maten y/o coman roedores y comadrejas, respectivamente. En el área de Amamá, la prevalencia de *T. cruzi* en comadrejas (*Didelphis albiventris*) cayó desde el 32-36% en 1984-1991 (Schweigmann y col., 1999) al 8% en 2002-2004 (Ceballos y col., 2006). Durante este último periodo, un zorrino (*Conepatus chinga*) fue el único ejemplar de otra especie hallada infectada con *T. cruzi* entre unos 500 mamíferos silvestres y roedores capturados localmente y examinados para determinar su infección (Ceballos y col., 2006). Por lo tanto, es altamente improbable que los perros o gatos se infecten por comer triatomíneos o mamíferos silvestres infectados con *T. cruzi* en este contexto.

2.4.7 Infección por *T. cruzi* en gatos

Al igual que los perros, los gatos tuvieron una prevalencia de infección por *T. cruzi* mucho menor a la registrada antes del rociado masivo con insecticidas (Gürtler y col., 1993). Este patrón también puede explicarse por la vigilancia vectorial sostenida, el rápido recambio poblacional y la baja tasa de inmigración de gatos desde áreas vecinas. El trabajo presente es el primero que incluyó la mayor cantidad de gatos en la región del Chaco y además es el primero en implementar el uso de tres técnicas serológicas para determinar la infección por *T. cruzi* en ellos. Los trabajos anteriores que utilizaron serología para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en gatos, únicamente utilizaron una técnica serológica [HAI en Chile por Schenone y col., (1991); aglutinación directa en Paraguay por Fujita y col., (1994)]. El único gato hallado seropositivo, (al que no pudo practicársele el xenodiagnóstico) tenía residencia permanente en una casa donde sólo se hallaron *T. infestans* en el 2000 (no infectadas) y en el 2002 (infectadas con *T. cruzi*). A pesar de que no es posible determinar el

momento preciso en que el gato contrajo la infección, constituye un caso autóctono compatible con transmisión vectorial.

2.4.8 Métodos de diagnóstico empleados

La alta concordancia entre los resultados obtenidos por serología y por xenodiagnóstico confirman la sensibilidad y la especificidad de las técnicas empleadas en perros (Lauricella y col., 1998), pero son necesarios más datos para concluir sobre el desempeño de las técnicas aplicadas en gatos. El único perro repetidamente seropositivo para *T. cruzi* y con xenodiagnóstico negativo desde el 2000 constituye el segundo caso de este tipo registrado en el área de estudio. Una explicación posible para este patrón podría ser una reacción cruzada inespecífica con anticuerpos de *Leishmania* (Vexenat y col., 1996), ya que este perro provenía de un área distante donde se reportaron casos humanos de leishmaniasis cutánea (Yadón y col., 2001). Sin embargo, al practicarse una prueba de ensayo rápido inmunocromatográfico para leishmaniasis visceral resultó negativa. La prueba ensayada fue Kalazar Detect™ Canine Rapid Test, InBios International, Seattle, WA. En el área de Amamá no se encontraron signos aparentes de infección por *Leishmania* en perros ni en humanos.

2.4.9 Los perros como centinelas de la transmisión vectorial

Nuestro estudio demuestra la efectividad del uso de los perros como centinelas naturales del riesgo de infección por *T. cruzi* durante la fase de vigilancia (Cohen y Gürtler, 2001; Gamboa, 1967; Gürtler y col., 2005; Forattini y col., 1978), siempre y cuando se colecten los datos demográficos relevantes para poder discriminar los casos introducidos o transmitidos verticalmente. A diferencia de los gatos, los perros cumplen con todas las características ideales de una especie animal usada como centinela de transmisión: son susceptibles y tienen una respuesta medible al agente de infección; tienen un territorio definido que se solapa con el que se desea monitorear; son accesibles, fáciles de enumerar y capturar, y poseen un adecuado tamaño poblacional que permite un muestreo representativo (Castañera y col., 1998, 1999).

2.4.10 Limitaciones del estudio

El objetivo de nuestro trabajo fue la realización de un censo de la población canina. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados para examinar la totalidad de los perros, una pequeña fracción de la población no pudo ser examinada. Estos perros si estuviesen infectados podrían modificar los resultados obtenidos. En particular, la ausencia de casos

incidentes para el periodo 2000 y 2002 podría verse afectada ya que en la vivienda A-109, donde habitaban 4 de los 12 perros infectados, no pudo examinarse en el 2002 ni el en el 2003 un perro que resultó seronegativo en el 2000 a pesar de reiteradas visitas a la vivienda.

2.5 Conclusiones

La muy baja prevalencia e incidencia de infección por *T. cruzi* en perros (y también en gatos) refleja una marcada declinación en la transmisión doméstica en áreas rurales altamente endémicas que experimentaron vigilancia vectorial continuada. Esta situación no puede generalizarse al nivel del departamento ni de la provincia, ya que en otras comunidades rurales fuera del área de estudio existiría un mayor riesgo de contraer la infección por *T. cruzi* como surge del análisis de factores de riesgo. En el 2002, los perros inmigrantes rurales o los perros con historia de viaje fuera del área de estudio presentaban una prevalencia de infección 5 veces mayor y tenían 12 veces más riesgo de estar infectados que los perros residentes permanentes. Esto sugiere que en los poblados rurales vecinos bajo un esquema de vigilancia vectorial más esporádica y sin supervisión ocurriría transmisión activa (Capítulo III).

La distribución heterogénea y elevada concentración de los perros infectados implica que algunas viviendas contribuyen desproporcionadamente a la transmisión de *T. cruzi*, lo cual es esperable que aumente el número de reproducción básico (R_0) de la infección, y en consecuencia se requieran mayores esfuerzos para eliminar al patógeno. Las viviendas que albergan perros y gatos infectados deberían ser el blanco de una vigilancia intensificada, ya que allí los vectores tienen mayores probabilidades de infectarse y disparar la transmisión local.

A pesar de hallarse infestaciones por *T. infestans* con muy bajas densidades de insectos, se detectó la aparición de nuevos casos de infección en perros y gatos. Este fenómeno observado también en humanos (Gürtler y col., 2005) indica la importancia de la detección temprana de la reinfestación luego de los rociados masivos con insecticidas. En áreas rurales de alto riesgo para la Enfermedad de Chagas del Gran Chaco, resulta crucial la implementación de una vigilancia vectorial sostenida y permanente con participación de la comunidad.

Capítulo III

Impacto del control vectorial comunitario sobre la infestación doméstica y la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Resumen

Se determinó el impacto relativo de dos estrategias de control vectorial comunitarias sobre la infestación por *Triatoma infestans* y la infección por *Trypanosoma cruzi* en *T. infestans*, perros y gatos domésticos en dos áreas rurales vecinas abarcando 40 pequeños poblados y 323 viviendas. La prevalencia y abundancia de infestación doméstica fue respectivamente 1,5 y 6,5 veces mayor en el área bajo acciones de control por pulsos no supervisadas, operando bajo los lineamientos del Programa Nacional de Control de Vectores (PNCV), que en el área bajo vigilancia vectorial sostenida y supervisada llevada a cabo conjuntamente por el grupo de investigación y el PNCV. Las prevalencias de infestación e infección variaron ampliamente entre grupos de poblados dentro de cada área. En el área bajo control por pulsos, la prevalencia de infección en *T. infestans*, perros y gatos fue de 2 a 3 veces mayor que en el área bajo vigilancia sostenida, la mayoría de los animales infectados calificaban como casos autóctonos, y había evidencias de transmisión activa reciente. La distribución de la infección estaba altamente agregada al nivel de la vivienda y resultó cercana a la “regla del 80/20”. Usando un análisis de regresión logística múltiple agregado por vivienda, se halló que la infección en perros estaba asociada positiva y significativamente a variables que reflejaban la exposición local a *T. infestans* infectados, demostrando un desempeño deficiente del sistema de vigilancia vectorial. Para áreas de alto riesgo como el Gran Chaco, interrumpir la transmisión vectorial doméstica de *T. cruzi* requiere rociados con insecticidas residuales más intensos, de mejor calidad, supervisados, sostenidos en el tiempo y combinados con la participación comunitaria y medidas de manejo ambiental.

3.1.1. Introducción

Los programas de control vectorial de la Enfermedad de Chagas típicamente no han alcanzado los niveles deseados de control o supresión vectorial. Esto se debe mayormente a la interrupción del financiamiento y provisión de recursos y a una reducida voluntad política (Días y col., 2002). En Argentina, el Programa Nacional de Control de Vectores (PNCV) para el control de *T. infestans* fue implementado a comienzos de los 1960s con una estructura eminentemente vertical (Segura, 2002; Zaidemberg y col., 2004). Siguiendo una descentralización desorganizada e incompleta a comienzos de los 1980s, el PNCV adoptó en 1992 una nueva estrategia de control vectorial denominada “Plan Ramón Carrillo”. Los objetivos de este programa fueron: i) el tratamiento químico con insecticida en todas las viviendas del área endémica, ii) la instalación de la vigilancia con participación comunitaria y a través de múltiples efectores, iii) la detección de infección chagásica en todos los niños menores de 15 años residentes en áreas bajo vigilancia, iv) la atención médica y el tratamiento supervisado de los infectados por *T. cruzi*, v) el control de la madre chagásica y su hijo hasta el año de vida, vi) el control de laboratorios y bancos de sangre, y vii) el control de donadores y receptores de transplantes de órganos (Zaidemberg y col., 2004). En relación a los primeros dos objetivos, este programa se basaba en el entrenamiento de los pobladores locales y de los agentes primarios de salud en las actividades de rociado con insecticidas de las viviendas y en el monitoreo de la reinfestación de las mismas (Segura, 2002). Se proveyó de rociadoras de compresión manual e insecticidas piretroides a los líderes comunitarios y a los agentes primarios de salud; y se les solicitó que registrasen a lo largo del tiempo las notificaciones de vinchucas y los tratamientos con insecticidas realizados. Las actividades de control vectorial se dividieron en una fase de ataque, en la cual todas las viviendas de un poblado debían rociarse con insecticidas dos veces en un periodo de 6 meses, y en una fase de vigilancia, en la cual todas las viviendas debían monitorearse para detectar la reinfestación y realizar rociados selectivos en caso de ser necesario. Según Segura (2002), durante 1993-2001, se rociaron con insecticidas durante la fase de ataque todas las 961.500 viviendas rurales del área endémica, y se consideró que el 85% de las viviendas se hallaban bajo vigilancia. Sin embargo, existen discrepancias en cuanto a la cobertura del rociado lograda por el programa al comparar con lo reportado por Catalá y col., (2004) y Zaidemberg y col. (2004). Este programa de control vectorial con participación de la comunidad fue gradualmente discontinuado durante los fines de los 1990's, y en consecuencia aumentó el número de casos agudos de Enfermedad de Chagas notificados oficialmente, en especial en la provincia de Santiago del Estero y otras provincias vecinas pertenecientes al Chaco argentino (Zaidemberg

y col., 2004). Entre 1998 y 2004, la tasa de rociado con insecticidas permaneció baja, alcanzando unas 60.000 viviendas rociadas por año. Desde entonces las acciones de control vectorial han sido erráticas, y principalmente dependientes de la voluntad política, conocimiento y presupuesto de cada provincia. El impacto de estas acciones de control acumuladas sobre la infestación doméstica y peridoméstica por *T. infestans* al nivel de la comunidad y sobre la transmisión de *T. cruzi* no ha sido evaluada.

Como parte de un estudio longitudinal dirigido al modelado y control de la transmisión de *T. cruzi* en un área rural bien definida en Santiago del Estero, todas las viviendas de cinco poblados vecinos (área núcleo, centrada en Amamá) han sido monitoreadas regularmente para detectar la reinfestación luego de una aplicación masiva de insecticidas residuales en 1992 (Gürtler y col., 2007b). El programa de vigilancia entomológica se basó en la participación comunitaria combinada con rociados profesionales focales durante 1993-1995, y en rociados selectivos realizados por los propios moradores y líderes comunitarios entre 1996-2004 (Cecere y col., 1999, 2002). El impacto a largo plazo de estas acciones de control sobre la infestación doméstica y peridoméstica por *T. infestans* y sobre la transmisión de *T. cruzi* fue evaluada mediante índices entomológicos y usando a los perros domésticos como centinelas naturales de la transmisión (Cardinal y col., 2006a, capítulo anterior), evitando de esta manera el tamizaje regular de las poblaciones humanas locales. La prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros disminuyó desde el 65,1% en el estudio de base al 4,7% a los 10 años de haber establecido la vigilancia vectorial sostenida. A su vez, la fuerza anual promedio de infección cayó 260 veces desde 72,7 por cada 100 años-perro en el estudio de base a < 0,3% en 2002 (Gürtler y col., 2005; Cardinal y col., 2006a).

En este trabajo se evalúa el impacto relativo de dos estrategias de control vectorial comunitario sobre la infestación y la transmisión de *T. cruzi* a *T. infestans*, perros y gatos domésticos en dos áreas rurales vecinas. El área núcleo experimentó una vigilancia entomológica sostenida, basada en la comunidad y supervisada por nuestro grupo de investigación en cooperación con el PNCV desde 1992. El área periférica operó bajo los lineamientos del programa “Plan Ramón Carrillo” entre 1993 y 1999 y bajo distintas variantes de éste posteriormente. Esto llevó a que las aplicaciones de insecticidas realizadas por la comunidad y promovidas por el PNCV se hicieran en pulsos y sin supervisión.

3.1.2 Objetivos particulares

- Determinar la prevalencia de infestación por *T. infestans*, la abundancia del vector y la ocurrencia de infección en vectores, perros y gatos domésticos en un área operando bajo los lineamientos oficiales.
- Evaluar la distribución por viviendas de la infección por *T. cruzi*.
- Determinar los factores de riesgo asociados a la prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros y gatos.

3.1.3 Hipótesis de trabajo

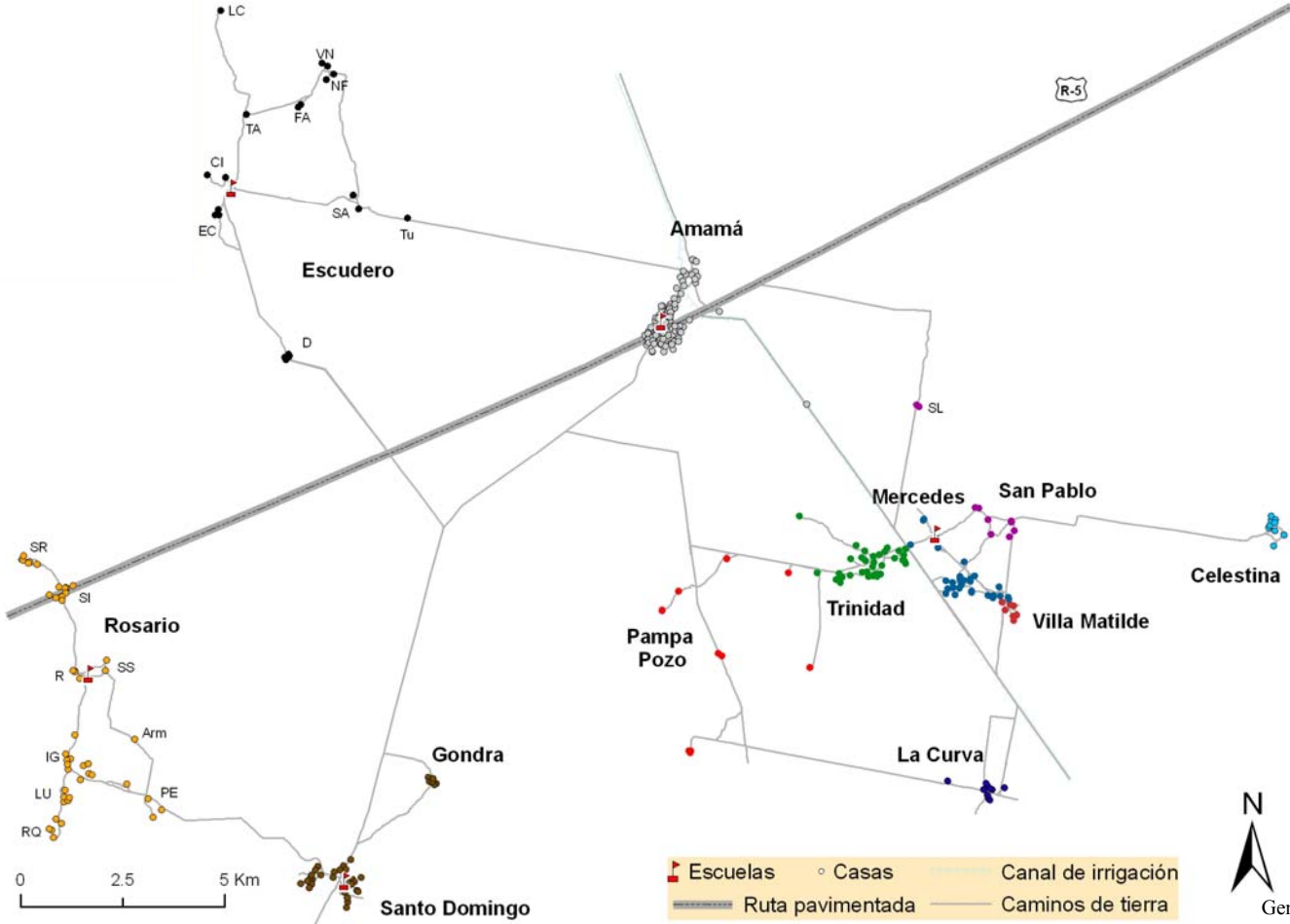
- Debido a las rápidas tasas de recuperación de las poblaciones locales de *T. infestans* y de la transmisión doméstica en ausencia de vigilancia sostenida (Gürtler y col., 2005), hipotetizamos que la infestación doméstica y la transmisión sería más intensa en el área bajo control vectorial por pulsos y no supervisado, y en aquellas viviendas donde habitaban perros y gatos infectados.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1 Área de estudio

El área de estudio abarca aproximadamente unos 600 km² del Depto. Moreno, Santiago del Estero, e incluye varios poblados alrededor de Amamá (27°12'33''S, 63°02'10''W). El departamento Moreno fue el que registró el mayor número de casos agudos de Chagas notificados en el país. El área y su historia de infestación por *T. infestans* fueron descriptas anteriormente (Gürtler y col., 1994; Ceballos y col., 2006; Cecere y col., 2002). Resumidamente, se visitaron dos áreas (Figura 3.1): (i) el núcleo, que incluye Amamá, Trinidad, Mercedes, Villa Matilde y Pampa Pozo, con 137 viviendas; y (ii) la periferia, que rodea al núcleo y que abarca 33 poblados rurales y 2 asentamientos aislados totalizando 186 viviendas (La Celestina, San Ramón, San Isidro, El Rosario, San Salvador, Fracción El Rosario, Armonía, San Ignacio, San Pedro, Santos Lugares, San Roque, Santo Domingo, Gondra, Cañada Central, Central Dolores, Esperanza, La Dormida, Laprida, Las Cañitas, Villa Isabel, San Pablo, San Luis, Barrio Pampa Pozo, La Curva, Lote S, Dolores, Escudero, La Favorita, La Nueva Fortuna, Tacoyura, Santa Ana, Santa María, Santo Domingo de los Cisneros, Turquía y Villa Napenay). En el área periférica las acciones oficiales de control vectorial se realizaron principalmente en dos pulsos: en 1993-1996, bajo el “Plan Ramón Carrillo”, y en 2000-2001, cuando la ocurrencia reciente de casos sintomáticos agudos de

Figura 3.1. Mapa del área de estudio con la ubicación de las viviendas rurales pertenecientes a cada poblado (indicadas con colores diferentes) y la ubicación de las escuelas primarias. Los códigos de letras indican los nombres de los poblados (pequeños grupos de casas pertenecientes a una o unas pocas familias) que conforman cada comunidad: LC (Las Cañas), TA (Tacoyura), FA (La Favorita), VN (Villa Napenay), NF (Nueva Fortuna), SA (Santa Ana), Tu (Turquía), CI (Cisneros), EC (Escudero), D (Dolores), R (San Ramon), SI (San Isidro), SS (San Salvador), R (Rosario), IG (San Ignacio), Arm (Armonía), PE (San Pedro), LU (Santos Lugares), RQ (San Roque), SL (San Luis).



Gentileza de G.M. Vazquez-Prokopec

Enfermedad de Chagas precipitó una nueva ronda de rociados con insecticidas residuales. Como parte de la investigación en curso, en abril del 2004 todas las viviendas fueron rociadas con insecticidas piretroides por el personal del PNCV con la supervisión de nuestro grupo de investigación y la reinfestación fue luego monitoreada.

3.2.2 Colección de triatominos

Dos equipos de 4 personas cada uno (3 evaluadores expertos del PNCV y 1 encuestador) visitaron un total de 186 viviendas del área periférica en octubre-noviembre del 2002. Prácticamente la totalidad (93,4%) de las 137 viviendas del área núcleo habían sido evaluadas en octubre (ver capítulo anterior). En cada vivienda, se realizó una encuesta donde se preguntaba a los moradores por sus prácticas habituales para el control del vector y su percepción de la reinfestación (Cecere y col., 1998). En la encuesta se preguntaba si habitualmente utilizaban insecticidas domésticos o realizaban alguna práctica en especial para ahuyentar los insectos (por ej., “humear”, hábito de encender ramas de arbustos locales para ahuyentar los insectos con el humo), si habían avistado triatominos en sus viviendas (tanto en el domicilio como en el peridomicilio) y en qué circunstancia (por ej., mientras que corrían enseres para realizar la limpieza, al prender un farol al anochecer, etc.). Para poder identificar al triatomo referido se preguntaba sobre el aspecto del mismo a la vez que se mostraban especímenes muertos para facilitar su reconocimiento. Además se preguntaba cuándo fue realizado el último rociado de la vivienda con insecticidas, quién lo realizó, cuáles fueron los ecotopos rociados, qué insecticida aplicó y la cantidad utilizada.

Un grupo de evaluadores experimentados del PNCV buscaron triatominos en todas las habitaciones de la vivienda (sitios domésticos, 1 persona) y en todos los sitios peridomésticos (2 personas) utilizando tetrametrina 0,2% (Icona, Buenos Aires) como agente desalojante durante 30 minutos por vivienda (Gürtler y col., 1999) en todas las viviendas donde los moradores se hallaban presentes (N = 176). Además se solicitó a los moradores que recolectasen los triatominos hallados invadiendo la vivienda en una bolsita plástica autosellable y que los guardasen hasta nuestra próxima visita. Todos los triatominos fueron identificados y procesados como fue descripto previamente (ver capítulo anterior).

3.2.3 Animales domésticos

El estudio de los animales domésticos se realizó en un subgrupo de los poblados más cercanos a Amamá donde se había evaluado la infestación. Se realizó un censo vivienda por vivienda de todos los perros y gatos a lo largo de tres campañas (noviembre de 2002, marzo y julio de

2003), totalizando 103 viviendas de 17 poblados y 2 asentamientos aislados del área periférica. Se completó el mismo cuestionario para cada animal que en el trabajo anterior (ver capítulo 2, Anexo 1). En él se preguntaba el nombre, edad, sexo y lugar de nacimiento de cada perro y gato que poseían en la vivienda; el nombre de la madre del animal y su historia de viaje o residencia en poblados fuera del área de estudio; la función principal del animal en la vivienda, y detalles sobre sus hábitos reproductivos y conductuales.

Se examinó un total de 221 (85%) de 260 perros y 61 (76%) de 80 gatos para diagnosticar la infección por *T. cruzi*. Todo el procesamiento de muestras y animales fue realizado de acuerdo al protocolo de ética N° 04223 del Comité Institucional para el Cuidado y Uso Animal de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, Estados Unidos como fue descrito en el capítulo anterior. Treinta perros y 18 gatos < de 3 meses de edad se examinaron solamente mediante xenodiagnóstico, mientras que a los animales mayores se les tomó una muestra de sangre mediante punción venosa y se diagnosticaron mediante serología; a un subgrupo de éstos también se los examinó mediante xenodiagnóstico (124 perros y 30 gatos). Cinco perros y 10 gatos mayores de 3 meses de edad que no pudieron ser sangrados fueron examinados solamente por xenodiagnóstico. Seis perros seropositivos fueron examinados por xenodiagnóstico en marzo o julio del 2003 para confirmar la infección por *T. cruzi* y para aislar parásitos; un perro seropositivo murió antes de que pudiera practicársele el xenodiagnóstico. El serodiagnóstico y xenodiagnóstico fueron realizados según lo descrito en el capítulo anterior.

3.2.4 Análisis de datos

Se utilizaron pruebas de Chi cuadrado (estadístico de Fisher) para comparar las proporciones de las clases de edad, las razones perro-humano, la infestación e infección entre áreas de intervención, las proporciones de infectados entre perros y gatos y las de animales infecciosos examinados en este estudio y los examinados previo al rociado masivo con insecticidas realizado en 1992 en el área núcleo. Se usaron pruebas de Mann-Whitney para comparar la media de hospedadores por vivienda y el número medio de visitas del personal de PNCV. Para realizar las comparaciones, los poblados que quedaban a menos de 2 km. de distancia dentro de cada una de las áreas de intervención fueron agrupados por vecindad. Para el cálculo de la media de la prevalencia de infestación o de infección sólo se consideraron los poblados con ≥ 6 viviendas o con ≥ 10 *T. infestans* o perros examinados para infección.

Se consideró “infeccioso” al animal cuyo xenodiagnóstico resultó positivo. La infectividad al vector se definió como el número de *T. infestans* positivas para *T. cruzi*

divididas por el total de insectos alimentados sobre un dado hospedador y examinados al menos una vez, excluyendo aquellos que no sobrevivieron a la primera examinación al microscopio.

Para evaluar la relación entre factores de riesgo potenciales y la infección por *T. cruzi* en perros (número examinado, N = 221) y gatos (N = 61) del área bajo acciones de control por pulsos, se calcularon razones de probabilidad (RP, u “odds ratios”) no ajustadas e intervalos de confianza del 95% (IC) mediante el método de Woolf en el análisis univariado. Las variables demográficas consideradas fueron: edad (en meses); sexo; residencia local permanente (2 niveles; nativos sin historia de viaje fuera de los poblados estudiados i.e., perros residentes permanentes, e inmigrantes rurales o urbanos y nativos con historia de viaje); el número de perros o gatos infectados con *T. cruzi* con el que el animal cohabitaba (0-4), y hábito cazador (2 niveles). Se tomaron como niveles de referencia el menor grupo de edad, machos, residencia local no permanente, no cohabitar con un animal infectado, y no tener hábito cazador, respectivamente. Las variables relacionadas al control vectorial se derivaron de registros del PNCV y de las encuestas realizadas a los moradores e incluyeron la ocurrencia de algún rociado con insecticidas en la vivienda del perro a lo largo de su vida (2 niveles). Además se calcularon las siguientes variables al nivel de la vivienda: intensidad de rociado con insecticidas (3 niveles: viviendas rociadas 3, 2 o ≤ 1 vez durante 1994-2002); operador del rociado (2 niveles: profesional o no [i.e., líder comunitario, morador]); cobertura del rociado con insecticidas (4 niveles: vivienda completamente rociada, vivienda parcialmente rociada [i.e., al menos una estructura peridoméstica no fue rociada], sólo el domicilio fue rociado, sin rociar), y años transcurridos desde el último rociado (3 niveles: rociado durante los últimos 4 años, hacía 5-9 años y ≥ 10 años). Las variables entomológicas se derivaron de las capturas por hora-hombre y colecciones de los moradores realizadas en cada vivienda e incluyeron: ocurrencia (2 niveles) y proporción de *T. infestans* infectados por *T. cruzi* capturados en todas las estructuras de la vivienda del animal; la abundancia relativa de *T. infestans* (3 niveles: 0; 1-9; y ≥ 10 ejemplares capturados por 0,5 hora-hombre) capturadas en la vivienda del animal, considerándose separadamente en 2 estratos que se definieron de acuerdo a la probabilidad de ocurrencia de *T. infestans* infectados (domicilios y sitios peridomésticos cercanos [cocinas, hornos y depósitos]; y otros sitios peridomésticos [principalmente corrales y gallineros]); y la ocurrencia de *T. guasayana* o *T. garciabesi* en áreas domésticas o peridomésticas en la vivienda del animal (2 niveles). Las razones de probabilidad ajustadas y sus IC fueron estimados mediante un análisis de regresión logística

múltiple con un algoritmo de máxima verosimilitud (Stata 9.0, College Station, TX) de la misma manera que en el capítulo anterior.

3.3. Resultados

3.3.1 Características de las áreas estudiadas

Se registró un total de 1.408 personas en el área de estudio (Tabla 3.1). El número medio de habitantes por vivienda (4,8-4,6 personas) y el porcentaje de menores de 15 años de edad (40%-45%) no difirió significativamente entre áreas. Los materiales utilizados para la construcción de las viviendas fueron similares entre las áreas, y los revoques de las paredes presentaban muchas rajaduras o eran inexistentes en el 40%-48% de las viviendas. El área periférica presentó viviendas con significativamente mayor cantidad de techos de paja, de sitios peridomésticos y de gallinas por vivienda que el área núcleo. Además, en el área periférica, también fueron superiores la razón de perros por persona y el número medio de cabras por vivienda. De acuerdo a los registros del PNCV en esta área no se rociaron viviendas durante 1996-1998; la cobertura de los rociados fue baja durante 1999 (8%), alcanzó su máximo en el 2000 (44%), y volvió a disminuir en el 2001 (7%), año a partir de cual no se registraron más rociados hasta el rociado masivo realizado en abril del 2004. Por el contrario, en el área bajo vigilancia sostenida durante los cinco años entre 1997-2002, el rociado selectivo de los domicilios fue siempre $> 0\%$ y osciló entre un 6% al 27% de las viviendas por año. Los poblados bajo acciones de control por pulsos experimentaron significativamente menos visitas del personal del PNCV entre 1993 y el 2002 (3,5 visitas) que los poblados del área bajo vigilancia sostenida (9,4 visitas) (Tabla 3.1).

3.3.2 Infestación por triatomíneos

La prevalencia y la abundancia de infestación doméstica por *T. infestans* fueron 1,5 y 6,5 veces mayores en el área bajo acciones de control por pulsos que en el área bajo vigilancia sostenida y supervisada, respectivamente (Figura 3.2A). Las infestaciones en los sitios peridomésticos cercanos ($P = 0,009$) y en los corrales ($P = 0,004$) del área bajo acciones de control por pulsos fueron significativamente mayores que en área bajo vigilancia sostenida. Los gallineros y los corrales de cabras o cerdos fueron las estructuras peridomésticas más frecuentemente halladas infestadas y las que presentaban las mayores abundancias de triatomíneos en cada área.

Tabla 3.1 Características de dos áreas rurales vecinas bajo diferentes estrategias de control vectorial comunitario en Santiago del Estero, octubre 2002.

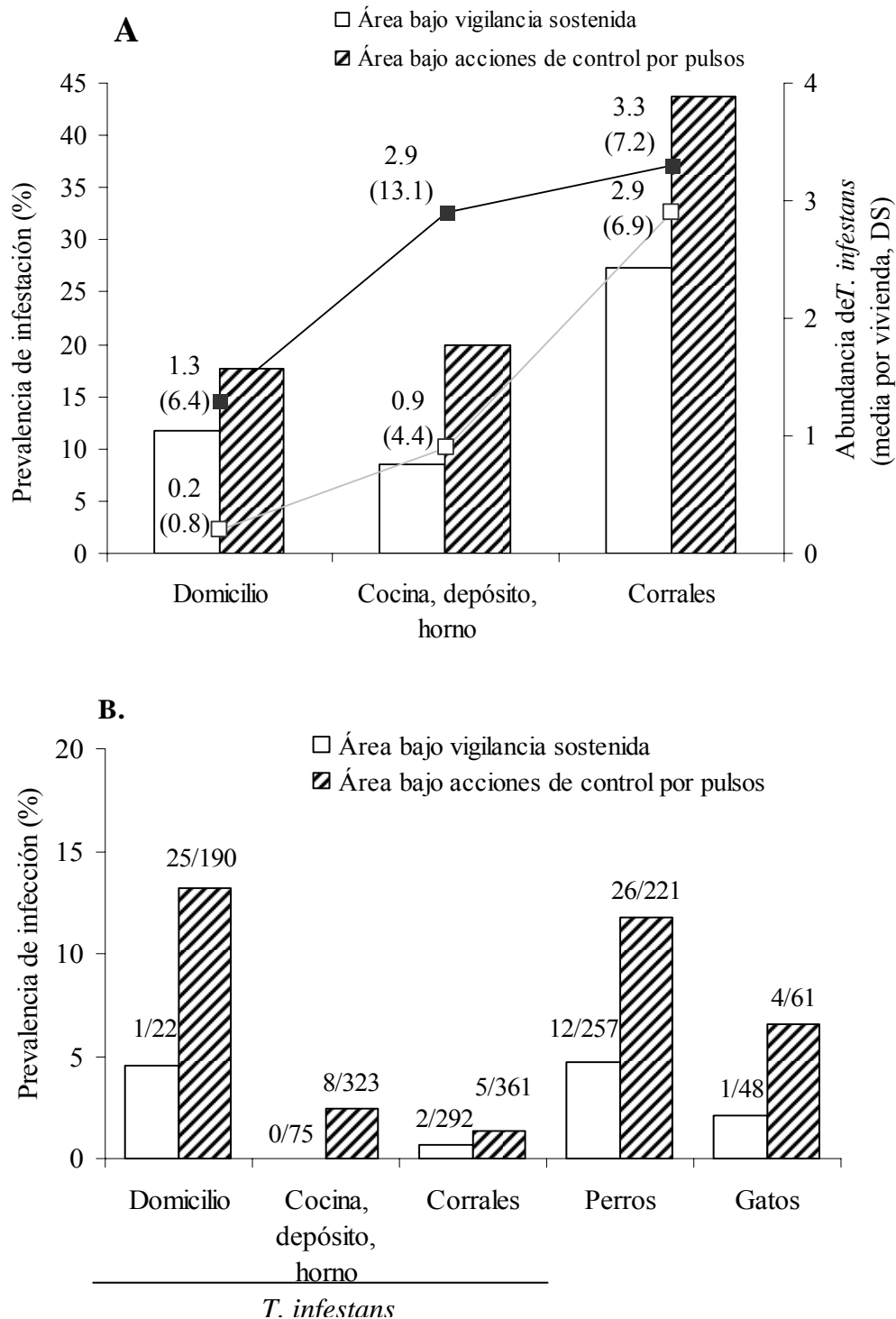
	Área bajo vigilancia sostenida	Área bajo acciones de control por pulsos	Prueba de significancia
Población total (% < 15 años)	595 (45%)	813 (40%) ^b	P = 0,07
Nº medio de personas por vivienda (DS)	4,8 (2,5)	4,6 (3,0) ^a	P > 0,25
Razón perro-humano (número total de perros)	0,47 (279)	0,58 (475) ^b	P < 0,0001
Viviendas con revoques en las paredes muy agrietados o inexistentes	40%	48% ^b	P = 0,23
Viviendas con techo de paja	87%	91% ^b	P = 0,006
Nº medio de sitios peridomésticos por vivienda (DS)	4,2 (2,1)	5,4 (3,0) ^a	P < 0,001
Nº medio de gallinas por vivienda (DS)	17,6 (16,1)	20,2 (14,9) ^a	P < 0,05
Nº medio de cabras por vivienda (DS)	6,2 (9,3)	8,2 (11,7) ^a	P > 0,15
Nº medio de visitas del personal del PNCV (DS)	9,4 (1,1)	3,5 (1,5) ^a	P < 0,001

^a Prueba de Mann-Whitney, ^b Prueba de Fisher.

3.3.3 Infección por *T. cruzi*

La prevalencia de *T. infestans* domésticos infectados con *T. cruzi* fue 2,9 veces mayor en el área bajo acciones de control por pulsos (13,2%) que en el área bajo vigilancia sostenida (4,5%) ($P = 0,04$) (Figura 3.2B). La prevalencia de infección en *T. infestans* fue mayor en los domicilios en ambas áreas, menor en los sitios peridomésticos cercanos en el área bajo acciones de control por pulsos (2,5%), y rara en los corrales (< 1,4%). La prevalencia de infección para el conjunto de todo el peridomicilio fue de 1,8% (número examinado, N = 737). No se detectó infección por *T. cruzi* en *T. garciabesi* (N = 151) ni en *T. guasayana* (N = 25). En el área bajo vigilancia sostenida, la infección por *T. cruzi* fue sólo detectada en el 2,5% de los machos de *T. infestans* (N = 120); no se detectó infección entre las ninfas de III o IV estadio (N = 74), de V (N = 113) y las hembras (N = 82) examinadas. En el área bajo acciones de control por pulsos, la prevalencia de infección aumentó desde el 0% en las ninfas de III o IV estadio (N = 175) al 3,3% en las de V (N = 243), y al 5,6% en los machos (N = 288) y 8,3% en las hembras (N = 168).

Figura 3.2: **A**, Prevalencia y abundancia de *Triatoma infestans* y **B**, prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* en *T. infestans*, perros y gatos de dos áreas rurales vecinas bajo diferentes estrategias de control vectorial en Santiago del Estero, octubre 2002- julio 2003. La abundancia media de *T. infestans* y (la desviación estándar) se muestran al lado de los cuadrados (A). Los números sobre las barras son los individuos infectados /examinados para la infección (B).



La prevalencia compuesta de infección por *T. cruzi* en el área bajo acciones de control por pulsos en comparación con la registrada en el área bajo vigilancia sostenida fue 2,5 veces mayor para todos los perros (11,8% vs. 4,7%, $P = 0,006$) y 3,1 veces mayor para todos los gatos (6,6% vs. 2,1%, $P = 0,38$) (Figura 3.2B). En la primera, los perros (11,8%) tenían una prevalencia de infección por *T. cruzi* 1,8 veces mayor que los gatos (6,6%) pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P = 0,35$).

Dentro de cada area de intervención, las prevalencias de viviendas infestadas y de *T. infestans*, perros y gatos infectados con *T. cruzi* varió ampliamente entre los distintos grupos de poblados (Tabla 3.2). Sin embargo, el área bajo acciones de control por pulsos fue la que presentó las mayores prevalencias de infestación en los domicilios (83%) y en los sitios peridomésticos (100%), y las prevalencias de infección más altas tanto en *T. infestans* (12,7%) como en perros (20,0%) y gatos (16,7%).

3.3.4 Demografía de las poblaciones de perros y gatos

De las 103 viviendas donde se examinaron los animales domésticos, 94% poseían al menos un perro y 61% poseían al menos un gato. El número medio de perros y gatos por vivienda fue de 2,6 (DS = 1,5) y 0,8 (DS = 0,8), respectivamente. Los perros fueron 3,3 veces más abundantes que los gatos (260 vs. 80, respectivamente) y la gran mayoría eran mestizos. La razón de sexos (machos a hembras, M:H) estuvo significativamente sesgada hacia los machos en los perros (M:H = 5,8; $\chi^2 = 128,4$; grados de libertad [gl] = 1; $P < 0,0001$) pero no en los gatos (M:H = 1,4; $\chi^2 = 2,5$; gl = 1; $P > 0,1$). Ambas poblaciones eran muy jóvenes, con una edad mediana de 2,0 años (primer y tercer cuartil [Q1-Q3] = 1-5) para los perros y 1,8 años (Q1-Q3 = 0-4) para los gatos. El porcentaje de individuos que habían nacido localmente fue significativamente mayor para los gatos (75%) que para los perros (57%) ($P = 0,004$). La mayoría de los perros y gatos se hallaban sueltos; el 40% de los perros eran usados para cazar. El 50% de los perros y el 68% de los gatos tenían el hábito de dormir en el interior de los domicilios.

Tabla 3.2 Prevalencia de infestación por *Triatoma infestans* e infección por *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans*, perros y gatos de dos áreas rurales vecinas bajo diferentes estrategias de control vectorial comunitario en Santiago del Estero, octubre 2002- julio 2003; nd, sin datos.

Grupo de poblados	N° de viviendas	Prevalencia de infestación (%)		Prevalencia de infección (número examinado)		
		Doméstica	Peridoméstica	<i>T. infestans</i>	Perros	Gatos
<i>Área bajo acciones de control por pulsos</i> ^b						
Celestina	7	0	57	0,0 (39)	nd	nd
Central Dolores	48	9	57	0,4 (254)	0,0 (26)	0,0 (11)
Escudero	22	10	40	3,1 (96)	nd	nd
Gondra	6	0	20	0,0 (1)	0,0 (14)	0,0 (1)
Laprida	20	5	63	1,5 (137)	nd	nd
La Curva	6	83	100	2,7 (73)	20,0 (20)	0,0 (4)
Pampa Pozo Barrio	2	0	0	-	0,0 (7)	-
Rosario	39	37	49	8,5 (235)	17,1 (76)	16,7 (18)
San Pablo	8	0	25	6,3 (16)	6,3 (16)	0,0 (6)
Santo Domingo	26	23	46	12,7 (71)	13,6 (59)	5,0 (20)
Total	186	17,6	50,7	4,1 (922)	11,8 (221)	6,6 (61)
Media (DS) ^a		18,5 (25,7)	50,7 (22,1)	3,6 (4,4)	8,1 (8,7)	-
<i>Área bajo vigilancia sostenida</i>						
Amamá	66	12	35	1,1 (176)	5,6 (144)	0,0 (22)
Mercedes	34	6	30	0,0 (117)	5,7 (53)	0,0 (12)
Pampa Pozo	9	0	33	0,0 (41)	0,0 (17)	0,0 (7)
Trinidad	28	23	23	1,8 (56)	2,3 (44)	14,3 (7)
Total	137	11,7	31,3	0,8 (390)	4,7 (258)	2,1 (48)
Media (DS) ^a		9,0 (9,9)	19,3 (11,6)	0,7 (0,9)	3,4 (2,8)	-

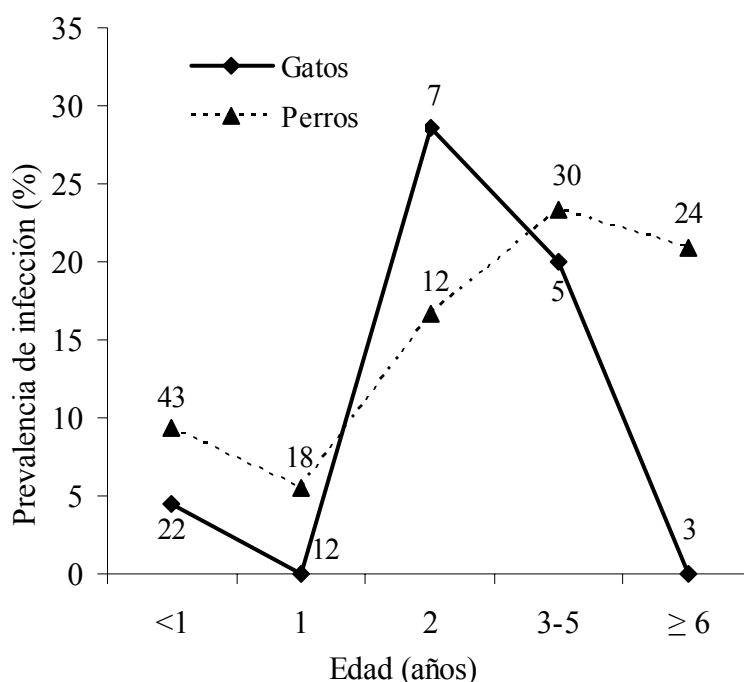
^a Para el cálculo de la media de la prevalencia de infestación o de infección sólo se consideraron los poblados con ≥ 6 viviendas o con ≥ 10 *T. infestans* o perros examinados para infección.

^b Excluye asentamientos aislados donde no se hallaron *T. infestans* (San Luis y Lote S). En el último no se detectó infección por *T. cruzi* en 3 perros y un gato examinados.

3.3.5 Prevalencia de *T. cruzi* por edad en perros y gatos

Las curvas de prevalencia por edad en los gatos y perros nativos del área bajo acciones de control por pulsos fueron muy similares hasta los 5 años de edad (Figura 3.3). Cuando la edad del hospedador fue dividida en dos clases (≤ 1 y > 1 de año), el análisis de regresión logística múltiple mostró que no existían efectos significativos del tipo de hospedador (perro o gato) sobre la infección por *T. cruzi* del hospedador (RP = 1,4; IC = 0,5-4,3) pero existían efectos significativos de la edad del hospedador (RP = 3,6; IC = 1,6-8,1) (Wald $\chi^2 = 13,4$; 2 gl; $P < 0,005$).

Figura 3.3 Prevalencia edad-específica de infección por *Trypanosoma cruzi* en perros y gatos nativos del área bajo acciones de control por pulsos en Santiago del Estero, noviembre 2002-julio 2003. Los números cercanos a los puntos representan el número de animales examinados para la infección. La figura excluye siete perros y tres gatos de edades desconocidas.



Entre los perros nativos del área bajo acciones de control por pulsos, la curva de prevalencia por edad aumentó constantemente desde 5-10% en ≤ 1 año de edad al 27% a los 3 años, y fluctuó entre 13 y 25% en los perros mayores (Figura 3.4A). En contraste, para el área bajo vigilancia sostenida, la curva de prevalencia por edad de los perros nativos menores de 10 años fluctuó debajo del 5% y sólo aumentó abruptamente al 35% entre los perros de ≥ 10 años, que se hallaban presentes en 1992 antes de la campaña masiva de rociado con insecticidas

(ver capítulo anterior). En el área bajo acciones de control por pulsos, la prevalencia de *T. cruzi* en perros inmigrantes (7,5%; N = 94) fue la mitad de la de los perros nativos (15,0%; N = 127) y tuvo un pico a los 2 años de edad (22%) y en los perros > 6 años (Figura 3.4B). La mayoría de los perros y gatos infectados (77%) en el área bajo acciones de control por pulsos eran animales nativos con residencia permanente, y por lo tanto califican como casos autóctonos.

3.3.6 Infectividad al vector

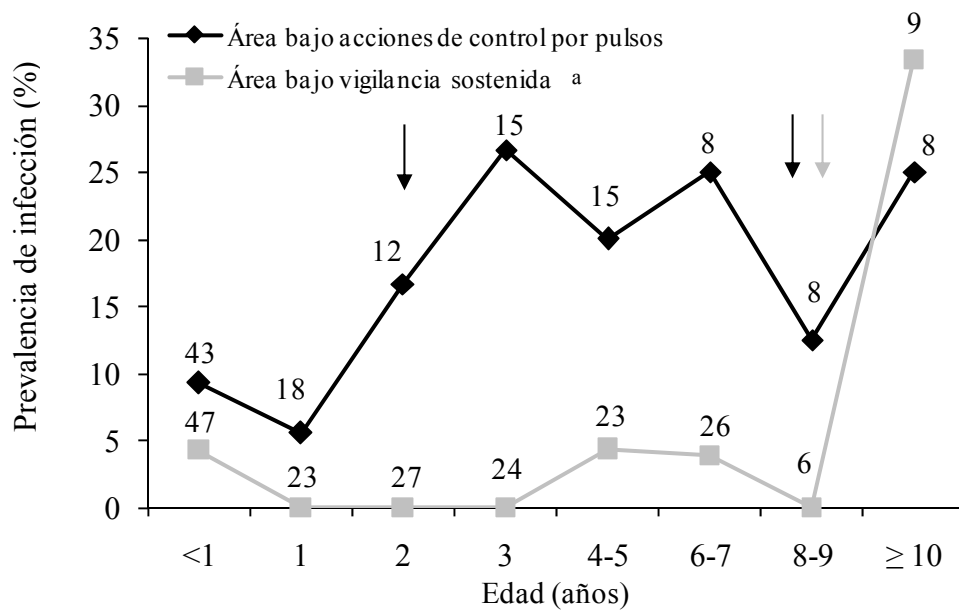
Sumando los individuos examinados por xenodiagnóstico en ambas áreas se utilizaron un total de 4591 ninfas de III y IV estadio de *T. infestans*, de las cuales 3846 fueron alimentadas sobre perros y 745 sobre gatos. Entre las alimentadas sobre los perros, la mortalidad registrada a la primera examinación fue del 6% y de las que quedaron vivas, el 33% mudó de estadio. Para los gatos la mortalidad observada fue también del 6% y el porcentaje de los insectos vivos que mudaron fue del 17%.

Dos cachorros examinados solamente por xenodiagnóstico de 3 días y 5 meses de edad infectaron un total de 9 triatominos y la infectividad observada para ellos fue del 20% (N = 5 ninfas alimentadas) y 100% (N = 8) respectivamente. La infectividad registrada para un perro serológicamente negativo pero con xenodiagnóstico positivo fue del 85% (N = 20). El porcentaje de perros seropositivos para *T. cruzi* que resultaron infecciosos para los *T. infestans* de xenodiagnóstico fue del 82% (N = 33) y no se halló relacionado con la edad del perro (Figura 3.5A). Un porcentaje similar (66%, N = 38) fue hallado por Gürtler y col., (2007a) en los perros hallados seropositivos antes del rociado masivo con insecticidas realizado en 1992 en el área bajo acciones de control supervisadas ($P = 0,11$). La infectividad a los *T. infestans* de xenodiagnóstico de los perros seropositivos fue del 42%, no estuvo asociada a la edad y se halló agregada al nivel del individuo (Figura 3.5B).

Para los gatos el porcentaje de animales infecciosos fue del 100% (N=3 gatos seropositivos). Un gato de 2 meses de edad, examinado sólo por xenodiagnóstico infectó un total de 9 triatominos de los 10 que se aplicaron en el xenodiagnóstico.

Figura 3.4 Prevalencia edad-específica de infección por *Trypanosoma cruzi* en perros A. Curvas de perros nativos de dos áreas rurales vecinas bajo diferentes estrategias de control vectorial comunitario en Santiago del Estero, noviembre 2002- julio 2003. B. Curvas de perros nativos del e inmigrantes al área bajo acciones de control por pulsos en Santiago del Estero, noviembre 2002- julio 2003. Los números cercanos a los puntos representan el número de perros examinados para la infección. La figura excluye 16 perros de edades desconocidas. Las flechas indican las principales campañas de rociados.

A.



^a Datos tomados de Cardinal y col. (2006a).

B.

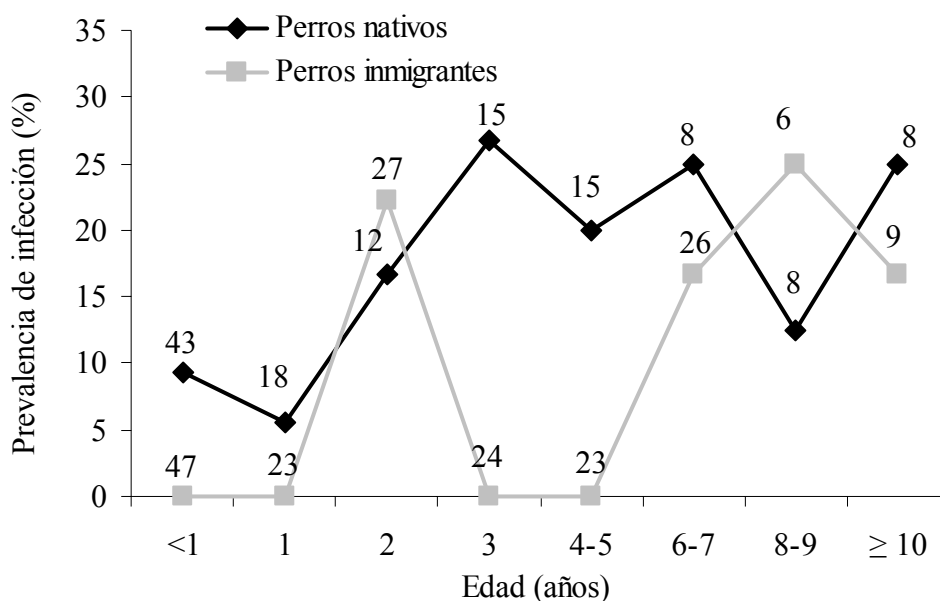
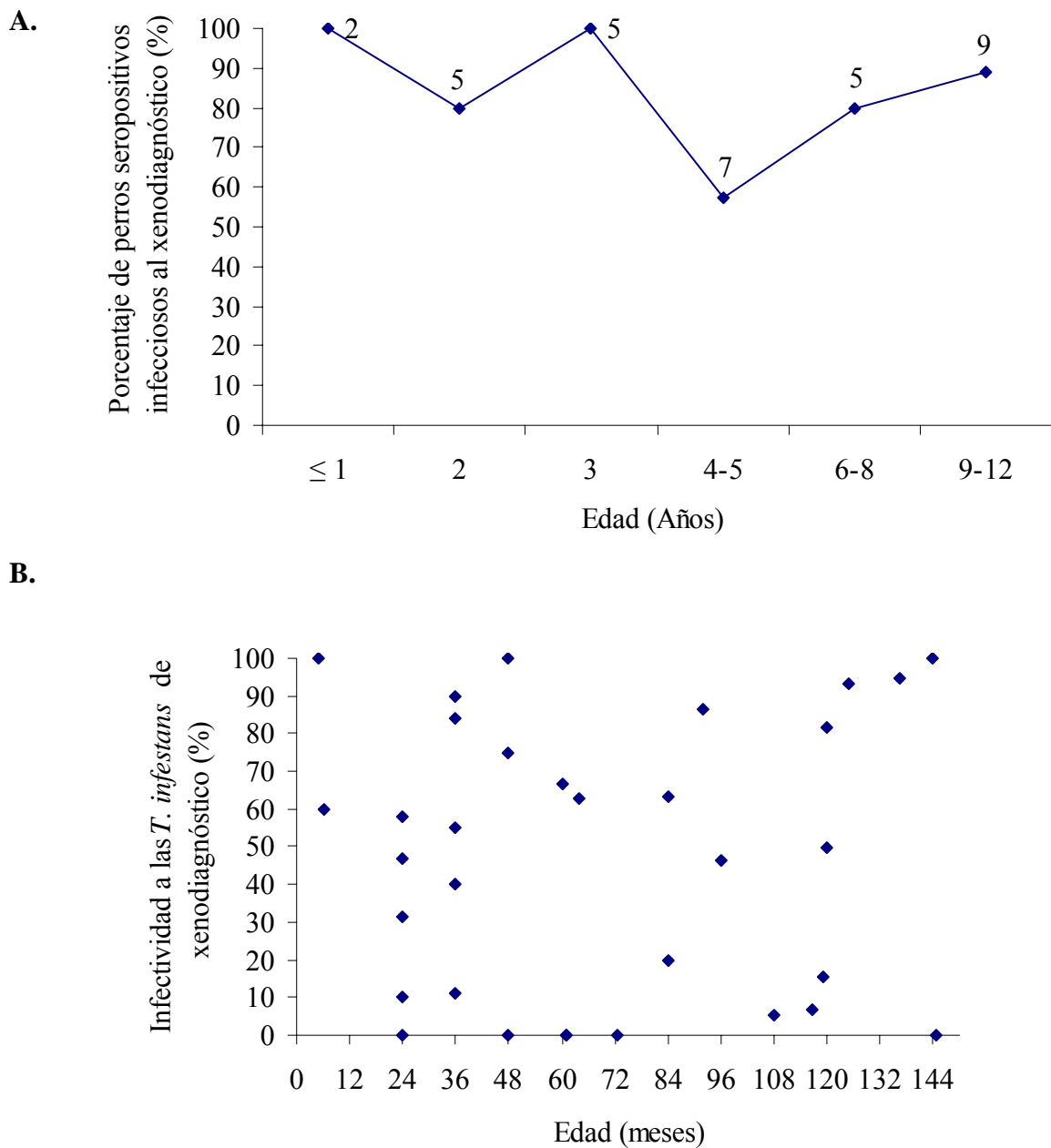


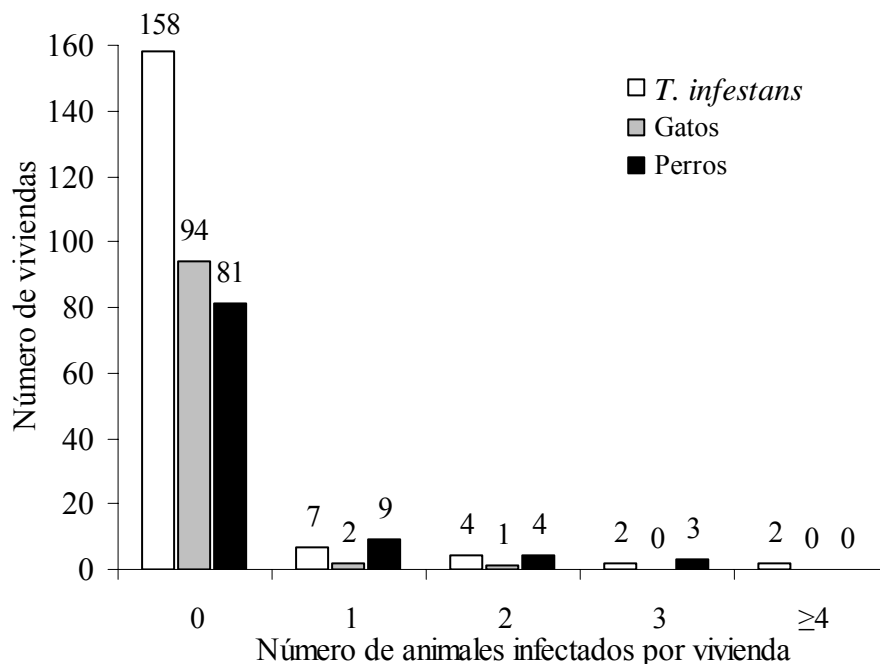
Figura 3.5 Infectividad edad-específica al vector de los perros seropositivos. **A**, Porcentaje de perros seropositivos que resultaron infecciosos a las *Triatoma infestans* de los xenodiagnósticos. **B**, Porcentaje de triatominos que resultaron infectados luego de una sola alimentación mediante xenodiagnóstico aplicados sobre perros seropositivos. Los números cercanos a los puntos representan el número de perros seropositivos examinados por xenodiagnóstico para cada clase de edad (**A**). Cada punto representa la infectividad individual de un perro (**B**).



3.3.7 Distribución de la infección por *T. cruzi*

En el área bajo acciones de control por pulsos, los 30 perros y gatos infectados detectados se hallaban en 16 (15,5%) viviendas de nueve poblados. En 10 de ellas (63%) se hallaron *T. infestans* infectados con *T. cruzi*; en 3 se hallaron *T. infestans* no infectados; en 2 no se hallaron *T. infestans* y una de las casas carecía de registros entomológicos. Sólo una pequeña fracción de las viviendas estudiadas albergaba a los animales infectados (9% para *T. infestans*, 3% para los gatos, 16% para los perros) (Figura 3.6), resultando en una alta agregación de la infección por *T. cruzi* al nivel de la vivienda (Prueba de varianza, $\chi^2 = 228,4$; gl = 96; $P < 0,0001$). Todos los gatos infectados cohabitaban con perros infectados ($P = 0,004$). Una de las viviendas tenía 3 perros infectados y 2 gatos infectados.

Figura 3.6 Distribución por vivienda de la infección por *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans*, perros y gatos domésticos del área bajo acciones de control por pulsos en Santiago del Estero, noviembre 2002- julio 2003. Los números sobre las barras indican la cantidad de viviendas.

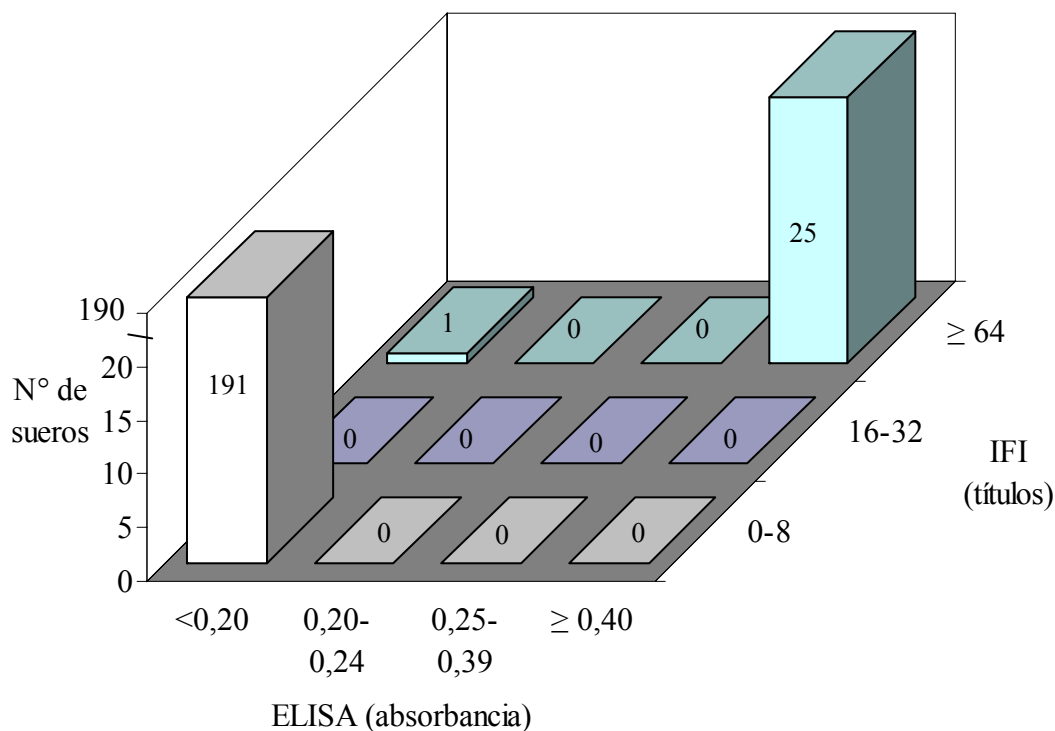


3.3.8 Comparación entre técnicas serológicas

Al igual que en el capítulo anterior, los títulos serológicos de los perros y gatos mostraron una clara distinción entre los sueros reactivos y los no reactivos, con una concordancia prácticamente perfecta entre ELISA e IFI (Figura 3.7). Un total de 191 sueros

(163 perros y 28 gatos) con valores de absorbancia por ELISA $< 0,15$ y títulos por IFI $\leq 1: 8$ fueron claramente negativos, mientras que 25 sueros (22 perros y 3 gatos) con ELISA $\geq 0,25$ e IFI $\geq 1: 64$ fueron claramente positivos. El único perro serológicamente discordante (ELISA $\geq 0,25$; IFI $\geq 1: 64$ y HAI $\leq 1: 8$) no fue examinado por xenodiagnóstico. La concordancia entre el xenodiagnóstico y el serodiagnóstico en perros fue del 96% (119/124) y del 100% (N = 30) en gatos. Cuatro perros de 2-12 años de edad fueron seropositivos para *T. cruzi* y tenían xenodiagnóstico negativos. Un solo perro de 5 meses de edad con residencia permanente en el área de estudio tuvo xenodiagnóstico positivo y fue seronegativo por las 3 técnicas. Este cachorro probablemente fuera un caso agudo de infección, ya que cohabitaba con dos perros y un gato todos infectados con *T. cruzi* en una vivienda donde además se recolectaron *T. infestans* domésticas infectados.

Figura 3.7 Distribución de frecuencias de los valores de absorbancia para la técnica de ELISA y de títulos para la técnica de IFI en perros y gatos del área bajo acciones de control por pulsos en Santiago del Estero, noviembre 2002- julio 2003.



3.3.9 Infección por *T. cruzi* y factores de riesgo potenciales

La relación entre la infección por *T. cruzi* en perros y factores de riesgo significativos por el análisis univariado se muestra en la Tabla 3.3. Siete perros cuya edad era desconocida y 10 perros cuyas viviendas carecían de registros entomológicos fueron excluidos del análisis de las correspondientes variables. En base al análisis de regresión logística múltiple de los datos agregados por vivienda, la infección por *T. cruzi* resultó asociada positiva y significativamente a la edad del perro, sexo (ser hembra), tener residencia permanente en el área bajo acciones de control por pulsos, el número de perros o gatos infectados con los que el animal cohabitaba, la abundancia conjunta de *T. infestans* capturados en domicilios y sitios peridomésticos cercanos de la vivienda del perro, y la proporción de *T. infestans* infectados capturados en la vivienda del perro (Wald $\chi^2 = 54,7$; 7 gl; $P < 0,0001$) (Tabla 3.3). Habitar en viviendas que sólo habían sido rociadas 2 veces entre 1994 y 2002 no fue un factor de riesgo significativo en el análisis de regresión. En el análisis univariado, la infección en los perros no estuvo asociada significativamente con tener un hábito cazador, el tipo de operador que efectuó el rociado con insecticidas, la cobertura del rociado, los años transcurridos desde el último rociado con insecticidas, la abundancia de *T. infestans* en corrales, o con la captura de *T. guasayana* o *T. garciabesi* en la vivienda del perro (datos no mostrados). Entre 33 perros para los cuales se conocía el nombre y la seroreactividad de la madre, tres perros infectados (37.5%) tenían madre seropositivas, mientras que sólo dos perros infectados (8%) tenían madres seronegativas.

En los gatos, la infección por *T. cruzi* estuvo asociada positiva y significativamente con cohabitar con al menos otro perro o gato infectado (RP = 58,2; IC = 2,8-1194,2), la abundancia de *T. infestans* en los sitios peridomésticos cercanos de la vivienda del gato (RP = 46,0; IC = 3,6-587,2), y la ocurrencia de *T. infestans* infectados en la vivienda del gato (RP = 103,0; IC = 4,8-2233,4). Ninguna de las variables estudiadas resultaron significativas en el análisis de regresión múltiple.

Tabla 3.3: Prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* y factores de riesgo potenciales en 221 perros del área bajo acciones de control por pulsos en Santiago del Estero, noviembre 2002-julio 2003.

Factor	% infectados (N)	Razones de	
		probabilidad no ajustadas (IC 95%)	Razones de probabilidad ajustadas (IC 95%)
Edad (en meses)	- (214)	1,0 (1,00-1,02)	1,0 (1,01-1,04)**
Sexo			
Machos	9,5 (189)		
Hembras	25,0 (32)	3,1 (1,2-8,1)	4,7 (1,1-21,0)*
Residencia permanente en los poblados del área de estudio			
No	7,1 (99)		
Si	15,6 (122)	2,4 (1,0-6,0)	3,8 (1,2-12,5)*
Nº de perros o gatos infectados con los que el perro cohabitaba	- (221)	2,5 (1,7-3,5)	2,0 (1,4-2,9)**
Intensidad de los rociados con insecticidas (entre 1994 y 2002)			
Tres veces	7,6 (119)		-
Dos veces	18,1 (83)	1,1 (1,1-6,5)	-
Una vez o nunca	10,5 (19)	1,4 (0,3-7,2)	-
Nº de <i>T. infestans</i> capturados en domicilios o sitios peridomésticos cercanos en la vivienda del perro			
0	2,6 (117)		
1-9	17,0 (53)	7,8 (2,0-30,0)	6,0 (1,4-24,9)*
≥ 10	31,7 (41)	17,6 (4,7-66,2)	6,7 (1,1-39,2)*
Proporción de <i>T. infestans</i> infectados colectados en el vivienda del perro	- (211)	23,0 (4,2-126,3)	5,1 (1,5-17,4)*

N, número de perros examinados para infección.

* P < 0,05; ** P < 0,01.

3.4 Discusión

3.4.1 Comparación entre áreas

Nuestro estudio demuestra la ocurrencia de transmisión activa de *T. cruzi* en poblados bajo acciones de control vectorial por pulsos, no supervisadas, comunitarias, operando bajo los lineamientos del PNCV durante una década, pero no en poblados vecinos que se hallaban bajo vigilancia vectorial comunitaria, sostenida y supervisada durante el mismo periodo de tiempo. La prevalencia de infección por *T. cruzi* en *T. infestans*, perros y gatos fue 2-3 veces mayor en el área bajo acciones de control por pulsos. Las infestaciones domésticas también eran más frecuentes y abundantes en esta área. En ella, el pobre desempeño del sistema de vigilancia vectorial, incluyendo la falta de cobertura total en los rociados con insecticidas, ausencia de supervisión e irregular suministro de insecticidas, llevó a una rápida recuperación de las poblaciones de *T. infestans* luego de los rociados y a la renovación de la transmisión del parásito dentro de los 2-3 años de ocurrida la reinfestación doméstica. Este patrón ya había sido descrito para un solo poblado del área núcleo a fines de los 1980s (Gürtler y col., 1994, 2005). En el área periférica, las acciones de control vectorial fueron altamente heterogéneas entre poblados y fueron mayormente desarrolladas en dos pulsos. En un análisis reciente del desempeño del PNCV en el departamento Moreno (donde se ubican los poblados estudiados) se halló que las acciones de control durante la fase de ataque no alcanzaron la cobertura total de todos los poblados rurales y que la reinfestación se hallaba altamente agregada a nivel geográfico (Vazquez-Prokopec, 2007).

3.4.2 Prevalencia por edad y acciones de control vectorial

Las curvas de prevalencia por edad reflejaron los principales pulsos de las acciones de control vectorial a pesar de que no fueron homogéneas ni simultáneas entre los poblados y viviendas estudiados. En los perros nativos del área bajo acciones de control por pulsos, la prevalencia de *T. cruzi* aumentó constantemente desde el 5-10% en los perros ≤ 1 año (nacidos en el 2001-2002) hasta aproximadamente el 25% en los perros de ≥ 3 años de edad (la mayoría nacidos luego de la primera ronda de rociados con insecticidas en 1993-1996). Esta curva refleja las acciones de control masivas realizadas en la mayoría de los poblados en dos pulsos; la nueva ronda de rociados de 2000-2001 fue precipitada por la ocurrencia reciente de casos sintomáticos agudos de Enfermedad de Chagas en humanos. Esta rápida recuperación de la transmisión doméstica de *T. cruzi* puede explicarse por los efectos combinados de la rápida reinfestación doméstica, la presencia de perros y gatos infectados

asociados a los domicilios, su alta incidencia de infección y alta infectividad a las *T. infestans* y la frecuente alimentación de estos vectores sobre ellos (Cecere y col., 2006, Gürtler y col., 2007a).

3.4.3 Comparaciones demográficas entre áreas

El área periférica era más rural (i.e., tenía más sitios peridomésticos, cabras, gallinas y perros), y una calidad de la construcción de la vivienda levemente inferior que el área núcleo bajo vigilancia sostenida y supervisada. Desconocemos si estas pequeñas diferencias entre áreas, sumadas a las marcadas diferencias en las tasas de rociados con insecticidas, podrían modificar la transmisión doméstica. Las costumbres y las prácticas de manejo de los animales eran muy similares entre las dos áreas de intervención. A diferencia del área bajo vigilancia sostenida donde los perros nativos con residencia permanente (5%) tenían una prevalencia de infección significativamente menor que los perros inmigrantes (11%) (Cardinal y col., 2006a; capítulo II), en el área bajo acciones de control por pulsos la mayoría de los animales infectados eran nativos con residencia permanente. Este patrón es consistente con un menor riesgo de infección para los perros que residían o inmigraban del área bajo vigilancia sostenida en comparación con los perros nativos residentes o que emigraban del área bajo acciones de control por pulsos. El hallazgo de un probable caso agudo de infección por *T. cruzi* en un cachorro que habitaba una vivienda infestada con *T. infestans*, perros y gatos infectados, brinda más evidencias de la ocurrencia de transmisión vectorial local al momento del estudio. Llamativamente, una prevalencia similar de infección por *T. cruzi* en perros (15,1%) fue registrada en un área rural bajo acciones de control irregulares ubicada a unos 150 km. de distancia en la misma ecoregión, en la provincia del Chaco (Diosque y col., 2004).

3.4.4 Factores de riesgo para la infección por *T. cruzi* en perros

La infección en los perros estuvo asociada positiva y significativamente con variables que reflejan la exposición local a *T. infestans* infectadas (Tabla 3.3), lo que sugiere que la ruta de infección más probable fue la vectorial y en la vivienda del perro. *T. infestans* fue la única especie hallada infectada con *T. cruzi* aún luego de 10 años de acciones de control vectorial en ambas áreas. La transmisión vertical podría explicar algunos de las infecciones en perros muy jóvenes. La ocurrencia de un cachorro con xenodiagnóstico positivo, nacido de una madre seropositiva y con xenodiagnóstico positivo, es muy probable que haya sido causada por transmisión vertical debido a que el cachorro tenía tan sólo tres días de edad cuando fue examinado, lo que es menor al periodo de latencia correspondiente a la transmisión vectorial

de la infección. Cohabitar con al menos un perro o gato infectado también estuvo significativamente asociado con la infección por *T. cruzi* en perros y gatos, lo que refleja la agregación de la infección al nivel de la vivienda. Los gatos probablemente estuvieran involucrados en el mismo ciclo de transmisión vectorial doméstico que los perros, como lo sugieren la asociación entre la infestación y la infección de los gatos además de la similitud de las curvas de prevalencia por edad de perros y gatos nativos (este trabajo, Gürtler y col., 2007a). Mayor evidencia a favor de esta hipótesis fue obtenida de la tipificación molecular de los aislados de *T. cruzi* provenientes de perros, gatos y *T. infestans* infectadas del área de estudio; ya que la mayoría de ellos compartían el sublinaje TCIIe (Cardinal y col., en prensa, ver capítulo 5).

3.4.5 Uso de los perros como centinelas de la transmisión

Los hallazgos de este trabajo dan mayor sustento al uso de perros como centinelas naturales de la transmisión doméstica y peridoméstica de *T. cruzi* (Gamboa, 1967; Gürtler y col., 1990; Castañera y col., 1998; Cardinal y col., 2006a). Diversos estudios demuestran que los perros infectados constituyen el principal reservorio doméstico de *T. cruzi* y un factor de riesgo para la transmisión doméstica en toda América Latina (Gürtler y col., 2005, 2007a; Crisante y col., 2006; Estrada-Franco y col., 2006). Llamativamente, en este estudio se observaron una muy elevada infectividad al vector de los perros seropositivos e infecciosidad similares a las registradas previamente en un escenario de elevada transmisión doméstica (Gürtler y col., 1992, 2007a). Esta elevada infectividad podría estar relacionada con el muy pobre estado de salud de los perros del área de estudio (Petersen y col., 2001) y con las cepas parasitarias que circulan en el área (Araújo y col., 2002). En conjunto, estos resultados refuerzan la importancia del rol de los perros como fuente de parásitos en nuestra área de estudio. Consecuentemente, el tamizaje regular de las poblaciones de perros domésticos para detectar la infección por *T. cruzi* podría usarse para identificar las viviendas (o los agregados de ellas) con perros infectados y alto riesgo de transmisión. Para este propósito podría usarse una prueba rápida inmunocromatográfica altamente sensible y específico (Cardinal y col., 2006b; ver capítulo 4) que además permitiría la implementación *in situ* de estrategias apropiadas, como la colocación de collares impregnados con insecticidas (Reithinger y col., 2006), tratamiento con drogas parasiticidas, sacrificio de los animales infectados, o rociados selectivos de las viviendas que los albergan.

3.4.6 Agregación de la infección

Este estudio es el primero en mostrar la agregación al nivel de la vivienda de la infección por *T. cruzi* en perro y gatos, hasta ahora sólo revelada para humanos (Mott y col., 1976). La infección de los hospedadores se concentró en una pequeña fracción de las viviendas (15,5%) y cayó cercana a la “regla del 80/20”. Esta regla describe la contribución desproporcionada a la prevalencia de infección (80% o más) que es realizada por una pequeña fracción (20% o menos) de las viviendas y hospedadores (Woolhouse y col., 1997). Una elevada agregación de la infección por *T. cruzi* en perros y gatos también ocurrió en el área bajo vigilancia sostenida, donde los animales infectados (12 perros y un gato) se encontraban en 8,4% de las viviendas. La agregación de la infección por *T. cruzi* al nivel de las vivienda es esperable que aumente el número de reproducción básico (R_0) de la infección y la intensidad de las acciones de control necesaria para interrumpir la transmisión. Sin embargo, tener en consideración esta heterogeneidad podría aumentar la efectividad de las actividades de control si se priorizasen efectivamente las viviendas que concentran los hospedadores reservorios infectados. Estas viviendas constituirían viviendas “clave” para la transmisión.

En la historia de las acciones implementadas para controlar la transmisión vectorial de *T. cruzi* existe una clara tendencia desde programas estructurados verticalmente hacia estrategias más horizontales en las cuales la comunidad juega un rol crucial durante la fase de vigilancia (Bryan y col., 1994). En este trabajo demostramos que una estrategia basada en la comunidad puede realmente ser exitosa en la reducción o control de la transmisión doméstica de *T. cruzi* (no en la eliminación de *T. infestans*) cuando es acompañada del aprovisionamiento de insumos necesarios efectuado a tiempo y de una supervisión externa a lo largo del tiempo. Es, sin embargo, esta sincronidad y periodicidad temporal lo difícil de alcanzar en las áreas rurales endémicas donde la población está distribuída en forma dispersa y el acceso por caminos de tierra es limitado, especialmente durante la temporada de lluvias.

3.4.7 Limitaciones del estudio

En el presente trabajo se incluyó un total de 323 viviendas, ubicadas en un polígono de aproximadamente 600 km² del Depto. Moreno, Santiago del Estero. En esta área pudimos detectar una elevada heterogeneidad en el desempeño del PNCV. Para concluir acerca del mismo, debería evaluarse el desempeño obtenido en un mayor número de viviendas, de otras áreas rurales, incluyendo diversas provincias políticas y fitogeográficas.

3.5 Conclusiones

Este trabajo permitió hallar evidencias de la ocurrencia de transmisión activa de *T. cruzi* en poblados bajo acciones de control vectorial por pulsos, no supervisadas, comunitarias, operando bajo los lineamientos del PNCV durante una década, pero no en poblados vecinos que se hallaban bajo vigilancia vectorial comunitaria, sostenida y supervisada durante el mismo periodo de tiempo.

La estrecha relación existente entre las curvas de prevalencia por edad y las principales acciones de control vectorial efectuadas en el área evidencian la utilidad del uso de los perros como centinelas de la transmisión doméstica del *T. cruzi*.

La concordancia obtenida entre el diagnóstico serológico y parasitológico demuestran la utilidad de las técnicas empleadas para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en perros y en menor medida en gatos (donde nuevas pruebas son necesarias). La aplicación de la misma metodología para la realización del xenodiagnóstico (misma especie de triatominos, número de ejemplares, estadios ninfales, tiempo de exposición y método de lectura) a lo largo del tiempo nos permitió la realización de comparaciones longitudinales.

La alta agregación de los hospedadores infectados contribuye a la existencia de viviendas de alto potencial de transmisión del *T. cruzi* en caso de reinfestarse y constituyen un potencial riesgo para la comunidad.

Capítulo IV

Uso de un ensayo inmunocromatográfico rápido para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en reservorios animales

Resumen

Se evaluó un dispositivo comercial para la detección de infección por *T. cruzi* en muestras de sueros de perros provenientes de áreas endémicas (N = 114) y no endémicas (N = 28) para la enfermedad de Chagas cuyos resultados de pruebas serológicas o de xenodiagnóstico eran conocidos. La prueba tuvo 100% de sensibilidad y especificidad en un procedimiento, y en otro 96% y 94%, respectivamente. Esta prueba rápida puede ser muy útil para encuestas por tamizaje en el marco de programas de vigilancia e intervención.

4.1.1. Introducción

Aunque existen diversos métodos de diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en laboratorio, ninguno es ideal para las campañas epidemiológicas que requiere el procesamiento y el tamizaje en masa de las muestras en sitios donde generalmente la infraestructura es pobre. La serología convencional que usualmente comprende alguna de las siguientes técnicas, inmunoensayo ligado a enzimas [ELISA], prueba de inmunofluorescencia indirecta [IFI], y prueba de hemoaglutinación indirecta [HAI]), suele ser difícil de realizar en el campo debido al requerimiento de equipamiento específico (i.e., IFI, ELISA), o la elevada sensibilidad de la técnica al polvillo (i.e., ELISA). La prueba de HAI, aunque es la más usada y comparativamente fácil de hacer puede arrojar resultados falsos positivos o falsos negativos debido al empleo de diferentes diluciones del suero, a la subjetividad en la lectura de los resultados o a la variabilidad observada de la especificidad entre lotes comerciales disponibles del kit (Anónimo, 1998; Lauricella y col., 1998; Oelemann y col., 1998; Segura y col., 2000). Las pruebas moleculares (i.e. PCR) son muy específicas pero tienen baja sensibilidad, requieren personal muy especializado y el equipamiento del laboratorio y reactivos son costosos (Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda, 2003). El hemocultivo y el xenodiagnóstico son actualmente las técnicas “gold standard” para el diagnóstico parasitológico de *T. cruzi* (Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda, 2003). A pesar de que el hemocultivo y el xenodiagnóstico son altamente específicas, su sensibilidad en la fase crónica de la infección es muy variable (por ej., 0-50% [Cerisola y col., 1971]), además de requerir mucho esfuerzo de trabajo y tiempo (por ej., por la necesidad de criar en masa las vinchucas para el xenodiagnóstico). El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en animales domésticos suele basarse en el xenodiagnóstico. A diferencia de lo que sucede para humanos, no existen kits comerciales de las pruebas de ELISA e IFI para animales. En estos casos se suele emplear la técnica de HAI ya que se emplea el mismo kit comercial que para los humanos (Schenone y col., 1991). Las técnicas de IFI y ELISA empleadas en animales domésticos son caseras (“home-made”) y únicamente implementadas en centros de investigación. Por lo tanto, una prueba de diagnóstico rápida, sensible y específica sería extremadamente valiosa para las campañas de tamizaje en masa e intervención ya que los resultados podrían obtenerse inmediatamente y las medidas de control podrían implementarse *in situ*.

Se han desarrollado pruebas rápidas mediante dispositivos inmunocromatográficos para una variedad de enfermedades tropicales incluyendo malaria (Wongsrichanalai, 2001), leishmaniasis (Reithinger y col., 2002), y esquistosomiasis (Bosompen y col., 1997), pero

sólo recientemente se empleó uno a gran escala para la Enfermedad de Chagas (Chippaux y col., 2008; Luquetti y col., 2003; Ponce y col., 2005). Actualmente existen en el mercado dos empresas que comercializan estas pruebas rápidas para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en humanos, InBios International, Seattle, WA; y Chembio Diagnostics Inc, New York. Ambas pruebas han resultado altamente sensibles y específicas: para la prueba Trypanosoma Detect™, InBios International, Seattle, WA, la sensibilidad y la especificidad fueron del 92,7% y 99,0% respectivamente (Brutus y col., 2008), mientras que para la prueba Chagas Stat-Pak™, Chembio Diagnostics Inc, New York, fueron del 98,5%-100% y 94,8%-99,9% respectivamente (Luquetti y col., 2003; Ponce y col., 2005).

Debido a que los gatos y especialmente los perros son importantes hospedadores reservorios de *T. cruzi* (Gürtler y col., 2005), podrían utilizarse como blancos de una estrategia para el control de la Enfermedad de Chagas (por ej., como centinelas naturales en los programas de vigilancia, para colocación de collares impregnados con insecticidas o quimioterapia [Reithinger y col., 2006]) si los animales infectados pudieran ser precisamente identificados con exactitud.

4.1.2 Objetivo particular

- Evaluar la sensibilidad y especificidad de un dispositivo inmunocromatográfico comercialmente disponible para detectar la infección por *T. cruzi* en sueros de perros con serología y xenodiagnóstico conocidos provenientes de áreas endémicas como no endémicas para la Enfermedad de Chagas.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1 Sueros examinados

Se utilizaron sueros de perros preservados a -20°C que habían sido colectados entre el 2000 y el 2003 durante extensas relevamientos seroparasitológicos para el estudio de la Enfermedad de Chagas en dos áreas del norte argentino: (i) en el poblado de Amamá y poblados vecinos en la provincia de Santiago del Estero (Cardinal y col., 2006a), y (ii) en un área delimitada por los ríos Teuco y Bermejito de la provincia del Chaco. Algunos de estos perros (N = 29) habían sido examinados también por xenodiagnóstico. Ensayamos las muestras por al menos dos de las siguientes técnicas estandarizadas (Lauricella y col., 1998): ELISA (valor de corte

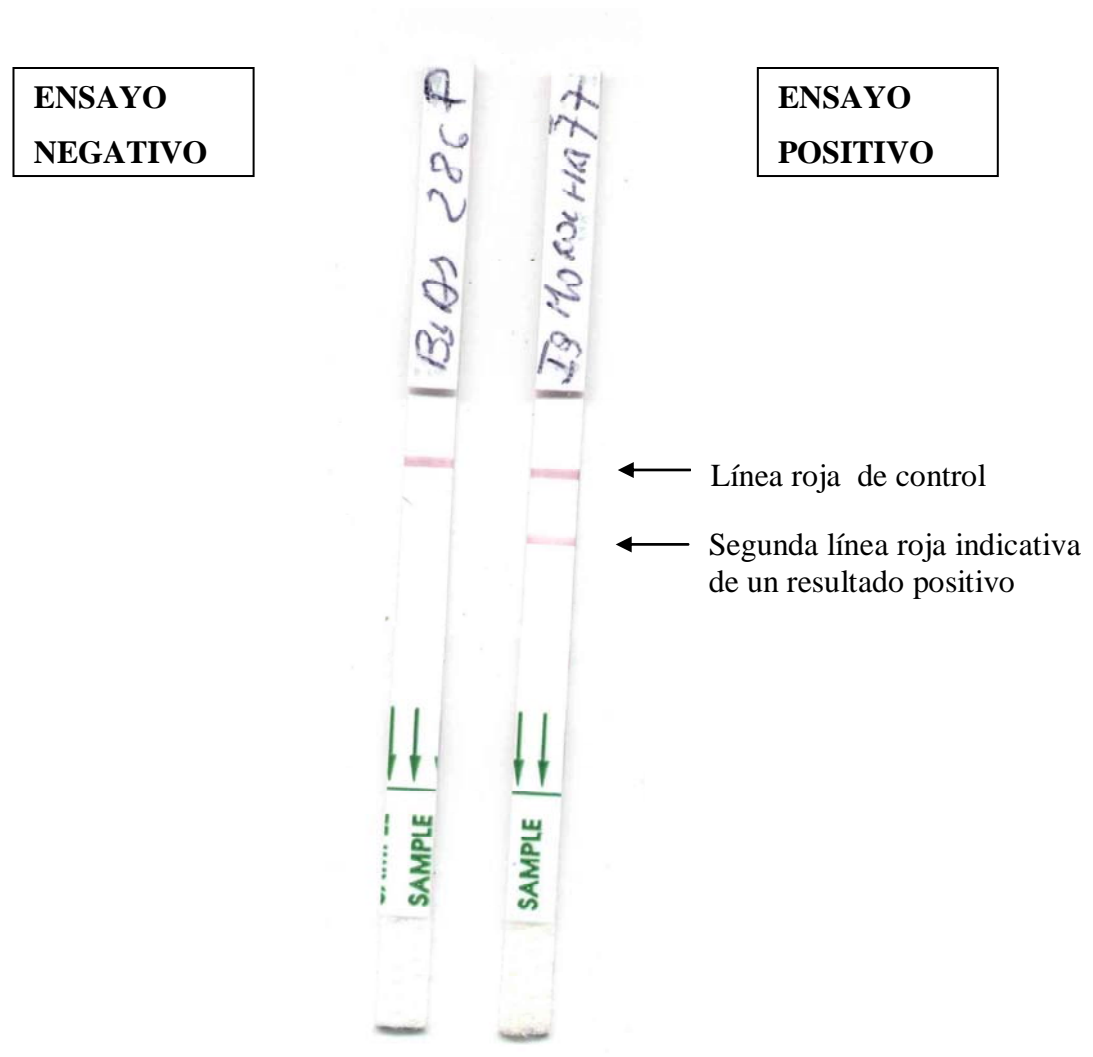
[lectura de densidad óptica]: 0,2; N = 141), IFI (valor de corte [título]: 1 :16; N = 141) y HAI (valor de corte [título]: 1 :16; N = 69) (Cardinal y col., 2006a).

Adicionalmente, se examinaron por las técnicas de ELISA e IFI 28 muestras de suero de perros residentes en la ciudad de Buenos Aires que fueron atendidos en el Instituto “Dr. Luis Pasteur”. La ciudad de Buenos Aires no es endémica para la infección vectorial por *T. cruzi*. Las muestras se clasificaron de acuerdo a los criterios de diagnóstico del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén”, por los cuales una muestra es considerada “serológicamente positiva” si es positiva por dos o más de las técnicas serológicas estandarizadas (Anónimo, 1998). Por conveniencia, en este estudio llamamos “serológicamente discordantes” a aquellas muestras de sueros que resultaron positivas sólo por una de las técnicas (entre ELISA, IFI y HAI) y a los sueros que diferían en el resultado obtenido entre la serología convencional y el ensayo inmunocromatográfico.

4.2.2 Ensayo inmunocromatográfico

Se llevó a cabo la prueba rápida con el dispositivo inmunocromatográfico *Trypanosoma cruzi Detect-CanineTM* (Inbios, Seattle) siguiendo las instrucciones del fabricante. A cada dispositivo se le agregaron 20µl de suero y 150-200µl de la solución “Chase Buffer” provista con el kit. Luego de 10 min. aparecía una línea roja de control en el área de prueba, y una segunda línea si el suero era positivo (Figura 4.1). La prueba se basa en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante el uso de antígenos recombinantes marcados con sales de oro. Los antígenos recombinantes contienen multiepitopes ITC-6 y ITC-8.2, que son derivados de diferentes antígenos de *T. cruzi* incluyendo los péptidos 2, TcD, TcF, TcLo, y SAPA (Syamal Raychaudhuri, Inbios, comunicación personal).

Figura 4.1 Fotografía del dispositivo para el ensayo inmunocromatográfico. A la izquierda se observa un ensayo negativo (una sola línea roja observada), a la derecha se observa un ensayo positivo (dos líneas rojas observadas).



4.3. Resultados

La Tabla 4.1 resume los resultados obtenidos con el ensayo inmunocromatográfico, la serología convencional y el xenodiagnóstico en las muestras de campo. Un total de 73/141 (52%), 71/141 (50%) y 20/29 (69%) dieron positivas por el ensayo inmunocromatográfico, la serología convencional y el xenodiagnóstico respectivamente. Ninguno de los 28 sueros caninos controles provenientes de la Ciudad de Buenos Aires resultaron positivos por ELISA, IFI o el ensayo inmunocromatográfico. Un total de 10/141 (7,1%) de las muestras estudiadas tuvieron resultados discordantes entre el ensayo inmunocromatográfico y la serología convencional (Tabla 4.1); una de ellas era un perro con xenodiagnóstico positivo correctamente detectado como positivo por el ensayo inmunocromatográfico pero no por la serología convencional. De las 10 muestras con resultados discordantes, dos seropositivas por ELISA e IFI, y por HAI e IFI respectivamente dieron negativas por el ensayo inmunocromatográfico; y dos muestras seronegativas sólo reactivas por IFI y HAI respectivamente resultaron positivas por el ensayo inmunocromatográfico.

Para estimar la sensibilidad y especificidad del ensayo inmunocromatográfico, el verdadero número de perros infectados debe ser conocido; y para lograrlo se utilizaron dos procedimientos. En el primero, las estimaciones se basaron en controles negativos conocidos (i.e., muestras controles negativos de la Ciudad de Buenos Aires) y muestras de campo positivas (i.e., muestras de perros con xenodiagnóstico positivo) de acuerdo con métodos estandarizados (Fleiss, 1981). Todas las muestras controles negativas resultaron negativas por el dispositivo inmunocromatográfico (i.e., 100% especificidad), y 20 de las 20 muestras con xenodiagnóstico positivo resultaron positivas por el ensayo inmunocromatográfico (i.e., 100% sensibilidad). En el segundo procedimiento, las estimaciones se basaron en los resultados obtenidos para las muestras de campo negativas al menos por serología (unas pocas también lo eran por xenodiagnóstico) y los controles de área no endémica, y para las muestras de campo positivas por xenodiagnóstico y/o serología, respectivamente. Un total de 93 de 99 muestras de campo y área no endémica serológicamente negativas resultó también negativo por el ensayo inmunocromatográfico (i.e., 94% especificidad); 67 de 70 muestras serológicamente positivas o con xenodiagnóstico positivo resultaron también positivas por el ensayo inmunocromatográfico (i.e., 96% sensibilidad). De 27 muestras que eran serológicamente positivas y por el ensayo inmunocromatográfico positivas, sólo 20 (74%) lo eran también por xenodiagnóstico.

Tabla 4.1 Diagnóstico comparativo de la infección por *T. cruzi* en muestras de suero canino colectadas en áreas endémicas del norte argentino.^a

Ensayo inmuno cromatográfico	Nº de sueros					
	Serología positiva			Serología negativa		
	XENO positivo	XENO negativo	XENO ND	XENO positivo	XENO negativo	XENO ND
Positivo	19 ^b	7	40 ^c	1	1	5 ^d
Negativo	0	0	3 ^e	0	1	64

^aSe utilizó el ensayo inmunocromatográfico *Trypanosoma cruzi Detect-Canine™* (InBios International, Seattle). Veinte y ocho muestras de sueros de perros residentes en la ciudad de Buenos Aires fueron negativos por todas las técnicas serológicas (el ensayo inmunocromatográfico y la serología convencional). Para la serología, todas las muestras fueron analizadas por ELISA, IFI y una fracción también por HAI. XENO, xenodiagnóstico; ND, no realizado.

^b Incluye una muestra seropositiva que fue reactiva sólo por ELISA e IFI.

^c Incluye tres muestras seropositivas que fueron reactivas sólo por IFI y HAI.

^d Incluye dos muestras que fueron reactivas sólo por IFI y una muestra que lo fue sólo por HAI.

^e Incluye dos muestras seropositivas que fueron reactivas sólo ELISA e IFI y por HAI e IFI, respectivamente.

4.4 Discusión

4.4.1 Desempeño del ensayo evaluado

Según nuestro conocimiento este es el primer estudio en utilizar un ensayo inmunocromatográfico para detectar la infección por *T. cruzi* en reservorios animales y fue el primer estudio en evaluar esta marca particular de dispositivos comerciales. Nuestro estudio indica que el dispositivo inmunocromatográfico evaluado tiene una alta sensibilidad (entre el 96-100%) y una alta especificidad (entre el 94-100%). El ensayo inmunocromatográfico tuvo una mayor sensibilidad que el xenodiagnóstico (de 27 muestras que eran serológicamente y por el dispositivo inmunocromatográfico positivas, sólo 20 (74%) lo eran también por xenodiagnóstico) y tuvo una sensibilidad comparable con las técnicas de ELISA e IFI convencionales (Lauricella y col., 1998). Recientemente, otra marca comercial de dispositivo inmunocromatográfico desarrollado para humanos (Chagas Stat-Pak™, Chembio Diagnostics Inc, New York) ha mostrado una sensibilidad y especificidad similarmente altas (> 98% y > 94%, respectivamente) cuando fue evaluado con un panel de muestras de sueros humanos seleccionados al azar (Luquetti y col., 2003) como así también con unas 3400 muestras de sueros humanos provenientes de bancos de sangre de América Central (Ponce y col., 2005).

También mostramos, como en otros estudios de diagnóstico que evaluaron la PCR (Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda, 2003), que con las técnicas estandarizadas de serología se pueden obtener falsos negativos. Este sería el caso de una de las dos muestras serológicamente negativas y positivas por el ensayo inmunocromatográfico pero que era también positiva por xenodiagnóstico. Esta muestra pertenecía a un perro del área bajo acciones de control por pulsos que habitaba una vivienda donde se habían hallado *T. infestans* infectados por *T. cruzi*, y que probablemente fuese un caso agudo de infección (i.e., en la fase pre-patente cuando la serología convencional habitualmente es no reactiva; ver capítulo anterior). El reconocimiento de este caso agudo probablemente se deba al epítopo SAPA (shed acute phase antigen) incluido en el dispositivo. Este antígeno ha sido propuesto como marcador de la infección aguda en humanos (Affranchino y col., 1989).

No podemos excluir la posibilidad de que el ensayo inmunocromatográfico resulte en una pequeña proporción de falsos negativos o positivos. Como lo han mostrado estudios similares evaluando dispositivos inmunocromatográficos para el diagnóstico de la malaria, esquistosomiasis y leishmaniasis, la variabilidad en el desempeño de los ensayos

inmuncromatográficos depende de diversos factores tales como el tipo de antígeno y conjugado utilizados. Los ensayos inmuncromatográficos comercialmente disponibles son altamente variables en cuanto a la sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica (Reithinger y col., 2002). Por ejemplo, las tasas de resultados falsos positivos para un ensayo inmuncromatográfico para malaria fueron del 28%, probablemente debido a una reacción cruzada con un factor reumatoide (Laferi y col., 1997). Para los perros estudiados que residían en la provincia del Chaco, podrían surgir resultados falsos positivos por una reacción cruzada con *Leishmania* spp. (Lauricella y col., 1998).

4.4.2 Potenciales ventajas del ensayo evaluado

Existen muchas ventajas potenciales del uso del ensayo inmuncromatográfico con respecto a otras técnicas diagnósticas. Primero, cuando se utilizan ensayos inmuncromatográficos se pueden procesar una gran cantidad de muestras rápidamente y con un esfuerzo mínimo. Segundo, comparado con la serología convencional, los métodos moleculares o el xenodiagnóstico, el grado de entrenamiento del personal y el conocimiento tecnológico necesarios para realizar la prueba inmuncromatográfica es mínima, como lo es también el requerimiento de equipamiento de laboratorio especializado. Otra ventaja de estos dispositivos es que los pacientes (o en este caso: los dueños de los perros) pueden ver los resultados ellos mismos, lo que podría contribuir a una mejor relación entre las comunidades locales y las personas que llevan a cabo las campañas. En tercer lugar, desde un punto de vista epidemiológico, la prueba inmuncromatográfica permite la implementación *in situ* de las estrategias de intervención, ya sea la vigilancia serológica, la colocación de collares impregnados con insecticidas, la quimioterapia, o la identificación de los animales (no) infectados para el aislamiento de parásitos, ensayos de vacunación. Esto reduce la necesidad de realizar visitas repetidas a las viviendas (lo que resulta necesario cuando se utilizan las técnicas serológicas comúnmente utilizadas), y por lo tanto se reducen los costos operacionales de los programas.

Los ensayos inmuncromatográficos son comparativamente costosos (los evaluados tenían un precio de mercado de US\$1,40 cada uno en el 2006), pero considerándose lo anterior, un ensayo inmuncromatográfico tan sensible y específico como el evaluado en este trabajo puede resultar una alternativa costo-efectiva a las técnicas diagnósticas actualmente disponibles, especialmente si se lo utiliza para encuestas por tamizaje en áreas rurales.

4.4.3 Limitaciones del estudio

Para la estimación de la especificidad del ensayo inmunocromatográfico utilizamos sueros de perros provenientes de la Ciudad de Buenos Aires. Sin embargo, lo ideal hubiera sido también incluir sueros de perros afectados por otras infecciones. Debido a las reacciones cruzadas reportadas entre la serología convencional para detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* y la Leishmaniasis, sería deseable también evaluar el desempeño de este ensayo en áreas donde co-ocurran la Enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis canina (tanto visceral como cutánea). En estos lugares una falta de especificidad del ensayo podría arrojar falsos positivos y en el caso de implementarse alguna estrategia de control a partir de ellos, significar esfuerzos inútiles.

Para la realización del ensayo inmunocromatográfico se debe utilizar suero por recomendación del fabricante. Debido a que sería ventajoso poder realizar esta prueba a campo utilizando sangre entera, se debería evaluar previamente la validez de realizar el ensayo de esta manera ya que existen antecedentes de disminución de la sensibilidad en un ensayo inmunocromatográfico utilizado para diagnosticar humanos (Roddy y col., 2008).

4.5 Conclusiones

La elevada sensibilidad y especificidad obtenidas con este ensayo inmunocromatográfico lo constituyen una herramienta promisoría para encuestas por tamizaje en el marco de programas de vigilancia e intervención.

Capítulo V

Epidemiología molecular de la infección silvestre y doméstica por *Trypanosoma cruzi* en el Noroeste de Argentina

Resumen

La diversidad genética de las poblaciones de *T. cruzi* y la dinámica de transmisión del parásito han sido bien documentadas en las Américas, sin embargo pocos estudios se han realizado en la ecoregión del Gran Chaco, una de las más endémicas para la Enfermedad de Chagas. En este estudio determinamos la distribución de linajes de *T. cruzi* (identificados mediante estrategias de PCR) en *T. infestans*, perros y gatos domésticos, humanos y mamíferos silvestres de dos áreas rurales vecinas con diferente historia de transmisión y control vectorial. El linaje II predominó entre los 99 aislados caracterizados y el linaje I fue predominante entre los 6 aislados obtenidos de mamíferos silvestres. *T. cruzi* IIe predominó en los hábitats domésticos; fue hallado en 87% de los 54 aislados de *T. infestans*, en 82% de los 33 aislados de perros y en los 4 gatos hallados infectados. Los ciclos domésticos y silvestres se solapaban en el área de estudio a fines de los 1980s, cuando ocurría intensa transmisión doméstica, y en el presente aún se solapan marginalmente. La introducción de *T. cruzi* desde los hábitats silvestres a los domésticos ocurriría muy raramente en el actual contexto epidemiológico local. La distribución por vivienda de los linajes de *T. cruzi* muestra que las vinchucas, perros y gatos de una determinada vivienda comparten el mismo linaje parasitario en la mayoría de los casos. Basado en evidencia molecular, este resultado refuerza la importancia de los perros y gatos como reservorios domésticos de *T. cruzi*. También se informa por primera vez para la Argentina, la infección de perros domésticos y *T. infestans* con el linaje IIc.

5.1.1. Introducción

Para el control de las enfermedades causadas por tripanosomas, es crucial definir e identificar a las especies, subespecies, linajes, cepas y poblaciones de parásitos para permitir la investigación epidemiológica (Hide y Tait, 2004). La epidemiología molecular, que puede definirse como la aplicación de métodos de biología molecular para la investigación de la epidemiología de enfermedades infecciosas, emergió como una disciplina dentro de la parasitología en los 1980s. Esta disciplina utiliza marcadores moleculares que permitan definir e identificar unidades taxonómicas discretas con el fin de rastrear las poblaciones de parásitos a través de los diferentes hospedadores y vectores, determinar asociaciones con información geográfica, analizar variantes hospedador-específicas, e investigar asociaciones entre manifestaciones y severidad de la enfermedad y grupos particulares de parásitos (Constantine, 2003; Hide y Tait, 2004).

En el Gran Chaco, una región hiperendémica para la enfermedad de Chagas que se extiende sobre Argentina, Bolivia y Paraguay, se desarrollan tanto el ciclo doméstico de transmisión de *T. cruzi* como el silvestre (Gürtler, 2007). En esta región, *T. cruzi* ha sido hallado naturalmente infectando diversas especies locales de mamíferos silvestres (Carcavallo y Martínez, 1968; Ceballos y col., 2006; Diosque y col., 2003; Yeo y col., 2005), mientras que los vectores silvestres implicados sólo han sido identificados en Bolivia (Noireau y col., 2000). En el Gran Chaco, *Triatoma infestans* es el principal o único vector domiciliario; los perros, humanos y gallinas son usualmente las principales fuentes de alimentación para los *T. infestans* domésticos; y los perros y gatos son considerados los hospedadores domésticos reservorios de *T. cruzi* más importantes (Minter, 1976; Gürtler y col., 1997, 2007a, b).

En Argentina, muy pocos estudios han intentado tipificar las cepas locales de *T. cruzi* y los parásitos han sido caracterizados mayormente por electroforesis de enzimas multilocus (EEML, “Multi-Locus Enzyme Electrophoresis, MLEE”) (Montamat y col., 1987; 1992; 1996; De Luca d’Oro y col., 1993; Diosque y col., 2003) que definen zimodemas (Miles y col., 1977, 1978). Los zimodemas de parásitos reportados por De Luca d’Oro y col. (1993) fueron luego analizados por Barnabé y col. (2000) y re-interpretados como pertenecientes a los linajes TCI, TCIIb y TCIIc. En total, *T. cruzi* II (TCII) era más prevalente en el ambiente doméstico, y los mamíferos silvestres fueron hallados infectados con TCI y TCII (De Luca d’Oro y col., 1993). TCIIe fue por primera vez informado por Diosque y col. (2003) y TCIIc por Ceballos y col. (2006).

Como parte de un estudio longitudinal enfocado a modelar la dinámica de la transmisión y el control de *T. cruzi* en un área rural bien definida del noroeste argentino, hemos descrito la

prevalencia de infección por *T. cruzi* en dos áreas rurales vecinas con diferente historia de control vectorial e intensidad de transmisión (Cardinal y col., 2006, 2007; Gürtler y col. 2007b; ver capítulos 2 y 3).

5.1.2 *Objetivos particulares*

- Describir la ocurrencia y distribución de linajes parasitarios en vectores y hospedadores domésticos y silvestres para establecer si los ciclos de transmisión doméstico y silvestre se solapan o si existen independientemente en estas áreas.
- Analizar la distribución de linajes de *T. cruzi* entre triatominos, perros y gatos al nivel de la vivienda.

5.1.3 *Hipótesis de trabajo*

- Basados en evidencias previas (Cardinal y col., 2006, 2007; Gürtler y col., 2005, 2007a, b), hipotetizamos que los *T. infestans* domésticos y los hospedadores animales de *T. cruzi* de una misma vivienda deberían compartir el mismo linaje parasitario.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1 *Área de estudio*

Fue descrita en los capítulos II y III.

5.2.2 *Colección de triatominos*

Además de las capturas por hora-hombre y las realizadas por los moradores descritas en los capítulos 2 y 3, se realizaron capturas por trampa de luz. Estas colecciones se realizaron durante los meses de marzo (fin del verano), julio (invierno) y noviembre (primavera) del 2003, y en marzo 2004 (Vazquez-Prokopec y col., 2006). La trampa de luz consiste en una tela blanca (2 mt x 1 mt) colocada sobre un marco de madera de manera vertical que era alumbrada con una linterna provista de un tubo de luz negra (Vazquez-Prokopec y col., 2004). Las trampas de luz fueron colocadas cerca de sitios peridomésticos infestados con *T. infestans* y eran ubicados de manera de permitir una máxima visibilidad desde las estructuras circundantes. El trampeo comenzaba 15 minutos antes del atardecer y continuaba dos horas luego del mismo (Vazquez-Prokopec y col., 2006). El procesamiento de los triatominos colectados fue llevado a cabo de la manera descrita previamente.

5.2.3 Animales domésticos

Todo el procesamiento de muestras y animales domésticos y silvestres fue realizado de acuerdo al protocolo de ética N° 04223 del Comité Institucional para el Cuidado y Uso Animal de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, Estados Unidos como fue descrito en los capítulos II y III. Adicionalmente en noviembre de 2002 se realizaron hemocultivos a partir de perros y gatos que habían sido detectados infectados en relevamientos anteriores o que habitaban viviendas donde se habían colectado triatomíneos infectados en el año 2000 o en el 2002. Por cada animal se inocularon 2 tubos bifásicos con sangre heparinizada utilizando un mechero como fuente de esterilidad.

5.2.4 Humanos

Todo el procesamiento de muestras y de humanos fue realizado de acuerdo al protocolo de ética N° 02171 del Comité Institucional para el Uso de Humanos de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, Estados Unidos. Los objetivos del estudio fueron explicados a los pacientes y los participantes firmaron un consentimiento escrito. Los pobladores y sus familias fueron citados en las escuelas rurales de sus comunidades donde un grupo de médicos voluntarios del Hospital Pirovano (Buenos Aires) ofrecieron asistencia médica de diversas especialidades. En los años 2005 y 2006 se los convocó a la escuela de Mercedes y en el 2007 a la escuela de Amamá. Con el objetivo de estimar la prevalencia de infección por *T. cruzi* en la población humana se extrajo sangre mediante punción venosa de todos los pacientes atendidos en las escuelas. Las muestras de sangre fueron procesadas como ha sido descrito en los capítulos previos (capítulos II y III) y fueron congeladas hasta su procesamiento en la Ciudad de Buenos Aires.

Cada suero fue examinado para anticuerpos contra *T. cruzi* mediante el ensayo de hemoaglutinación indirecta (HAI; Polychaco, Buenos Aires, Argentina), la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), y el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) en el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén”-ANLIS. Los resultados obtenidos fueron volcados en certificados que fueron entregados a los respectivos pacientes.

Con el fin de obtener parásitos de humanos se realizaron hemocultivos y se practicaron xenodiagnósticos a los pacientes con serología positiva para *T. cruzi* previa. Los hemocultivos fueron realizados inoculando sangre heparinizada en 2 tubos bifásicos por paciente en el 2005. Para mejorar el rendimiento, en el 2007 se practicaron los hemocultivos incorporando diversas modificaciones al protocolo propuesto por Profeta Luz (1999). En primer lugar, el volumen de sangre heparinizada colectada fue de 15 a 17 ml. por paciente. En segundo lugar,

al no contar con una centrífuga refrigerada en el campo para lavar las muestras, se propuso alicuotar y sembrar las muestras en un medio de transporte adicionando igual volumen de medio de cultivo (LIT) de manera estéril a la sangre heparinizada y mantenerlas allí temporariamente hasta su posterior procesamiento en flujo laminar en Buenos Aires.

Los parásitos de humanos fueron finalmente obtenidos mediante xenodiagnóstico natural (en el 2006) y xenodiagnóstico artificial (en el 2007). El xenodiagnóstico artificial fue realizado como fue descrito por dos Santos y col. (1995) con la introducción de dos modificaciones: (i) la sangre heparinizada fue recolectada en tubos plásticos de centrífuga de 15 ml con sus extremos cortados a los que se les enganchaba la membrana de látex ajustada mediante un anillo de goma (“o-ring”); (ii) una serpentina de cobre fue enrollada alrededor de cada uno de los tubos de centrífuga que contenían la sangre para mantenerla a 37°C y a través de un motor eléctrico se bombeaba agua caliente al interior del tubo de cobre. Los procedimientos del xenodiagnóstico fueron los mismos que para los animales domésticos, con la diferencia de que se usaban 40 ninfas por cada paciente. La edad media de los pacientes examinados por xenodiagnóstico fue de 49 años (rango, 21-79, N = 9) en el 2006 y 44 años (rango, 28-62, N = 6) en el 2007.

5.2.5 Mamíferos silvestres

Los mamíferos silvestres fueron capturados y examinados para diagnosticar infección por *T. cruzi* en varias campañas desde marzo del 2003 hasta marzo del 2007 (Ceballos y col., 2006). Un total de 586 mamíferos silvestres de 17 especies diferentes fue examinado para determinar su infección por *T. cruzi* mediante xenodiagnóstico usándose 5 (en roedores, cávidos y marmosas), 10 (en armadillos) o 20 (en zorrinos, comadrejas y zorros) ninfas de tercer o cuarto estadio de *T. infestans* no infectadas, criadas en laboratorio como fue descrito previamente. Este estudio combina los resultados previamente publicados (Ceballos y col., 2006) y un total de 85 nuevas capturas realizadas durante marzo del 2007 con un esfuerzo total de 2.252 trampas National-noche y 1.062 trampas Sherman-noche.

5.2.6 Aislamiento de parásitos

Los procedimientos para realizar el aislamiento fueron descritos por Lauricella y col. (2005). Las heces de las vinchucas naturalmente infectadas o provenientes de xenodiagnósticos positivos eran cultivadas en medio bifásico compuesto por infusión de cerebro-corazón (brain-heart-infusion, BHI) y agar nutritivo mezclado con sangre de conejo desfibrinada; y también inoculadas en 2-4 ratones Balb-C. Los ratones eran sacrificados 1 mes

post inoculación para la realización de hemocultivos. Los cultivos eran mantenidos a 28°C, 50% de humedad relativa y el crecimiento de los parásitos era monitoreado microscópicamente cada 15 días durante 4 meses. Cuando se alcanzaban a desarrollar al menos 3×10^5 parásitos/ml, los cultivos se cosechaban y criopreservaban. Se denominó “aislado” a parásitos de *T. cruzi* cultivados y criopreservados que provenían de un individuo naturalmente infectado.

5.2.7 PCR

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito por Marcet y col. (2006). Las infecciones con *T. cruzi* fueron confirmadas por kDNA-PCR, reacción que amplifica un fragmento de 330 pares de bases (pb) de ADN del minicírculo del kinetoplasto usando cebadores y condiciones de ciclado ya publicadas (Schijman y col., 2003, Burgos y col., 2005). Las reacciones de PCR fueron realizadas bajo condiciones óptimas para prevenir la contaminación del ADN. Cada ronda de PCR incluía 100 fg de ADN de *T. cruzi* como control positivo, y agua destilada estéril en vez de ADN como control negativo. Alícuotas de 12 µl de los productos de la PCR eran visualizados bajo luz U.V. luego de las corridas de electroforesis en geles de agarosa al 2,5-4% conteniendo bromuro de etidio.

Los linajes de *T. cruzi* fueron identificados en muestras cultivadas de cada animal infectado mediante estrategias de PCR dirigidas a la secuencia líder (o “mini-exón), 18S rDNA, 24s alfa rDNA, y el marcador genómico A10 con la incorporación de la enzima polimerasa Taq platinum (Invitrogen, USA) como fue descrito por Marcet y col. (2006). Debido a la baja sensibilidad del marcador genómico A10, algunos aislados no pudieron identificarse claramente si pertenecían al TC IIB o TC IIE; estos casos fueron denominados TC IIB/e, pero para los análisis fueron considerados como TC IIE. Este estudio incluye los resultados de la identificación de linajes de las poblaciones de *T. cruzi* halladas naturalmente infectando *T. infestans* y mamíferos silvestres publicados previamente (Ceballos y col., 2006; Marcet y col., 2006) así como también los hallados en 69 nuevos aislados.

5.2.8 Análisis de datos

La distribución de linajes entre áreas de estudios, hábitats y hospedadores fue evaluada mediante pruebas exactas de dos colas de Fisher y pruebas de χ^2 , dependiendo del tamaño de la muestra. Con el fin de evitar celdas con bajas frecuencias esperadas, los linajes de *T. cruzi* con una sola observación fueron agrupados juntos. Las infecciones mixtas que incluían TCI y TCII fueron agrupadas con TCI. Para poder analizar la distribución por vivienda de los linajes

parasitarios, planeamos comparar los aislados provenientes de perros domésticos, gatos, *T. infestans* y humanos de la misma vivienda. Sin embargo, dado que sólo se obtuvieron dos aislados de humanos, la seropositividad a *T. cruzi* fue usada como una variable subrogante para indicar la ocurrencia de una fuente de parásitos de origen humano que no pudo ser aislada.

La infectividad al vector se definió como el número de *T. infestans* positivas para *T. cruzi* divididas por el total de insectos alimentados sobre un dado hospedador y examinados al menos una vez, excluyendo aquellos que no sobrevivieron a la primera examinación al microscopio, y fue calculada sólo para los animales con xenodiagnóstico positivo. Las relaciones entre la infectividad del perro al xenodiagnóstico (variable de respuesta binaria) y linaje parasitario y edad del perro fueron investigadas usando una regresión logística múltiple con la misma metodología aplicada en los capítulos 2 y 3; en este caso considerándose los efectos de agregación (debido al sujeto) sobre la posibilidad de infectar las vinchucas.

5.3. Resultados

5.3.1 Infección por *T. cruzi*

En total, 2.243 *T. infestans*, 697 perros domésticos, 109 gatos, 586 mamíferos silvestres y 612 humanos fueron examinados para determinar su infección por *T. cruzi* entre los años 2000 y 2007 (Tabla 5.1). Se detectó la infección por *T. cruzi* en 94 *T. infestans*, 57 perros domésticos, 5 gatos, 5 comadrejas y un zorrino. La prevalencia total de infección por *T. cruzi* fue del 0,8% entre 586 mamíferos silvestres examinados. En la campaña de 2007, sólo se halló una comadreja infectada y los mamíferos silvestres que resultaron negativos por xenodiagnóstico incluyeron 15 *Galea musteloides*, 5 *Didelphis albiventris*, 2 *Tolypeutes matacus*, 18 *Ctenomys* sp., un *Pecarí tajacu*, 6 *Chaetophractus villosus*, 2 *Thylamys pusilla*, 7 *Chaetophractus vellerosus*, 11 ratones sigmodontinos (8 *Graomys griseoflavus*, 2 *Calomys musculinus* y un *Calomys callosus*), un *Lagostomus maximus*, 15 *Conepatus chinga* y un *Lycalopex gymnocercus*.

En humanos la seropositividad a *T. cruzi* fue del 5,2% (N = 346) en el 2006 y 5,3% (N = 266) en el 2007 (Gürtler y col., 2007b). Para pacientes menores de 15 años de edad, la prevalencia de infección por *T. cruzi* fue del 0% (N = 180) en el 2006 y 0,8% (N = 133) en el 2007 (Gürtler y col., 2007b). Un paciente con xenodiagnóstico positivo fue hallado en el 2006 (11,1%; N = 9) y otro en el 2007 (16,7%; N = 6). La tasa de xenodiagnósticos positivos no difirió significativamente entre el 2006 y el 2007 a pesar de las diferencias metodológicas

empleadas (Prueba exacta de Fisher; $P > 0,50$. De un total de 140 individuos con parásitos cuyas muestras se intentaron cultivar pudieron criopreservarse exitosamente 110 (79%) aislados. A partir de 99 de ellos se logró identificar el linaje (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Infección por *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans*, hospedadores silvestres y domésticos, intentos de aislamientos de parásitos e identificación de linajes. nd, no realizado.

Hospedador	Fecha de la campaña	Área	(N° examinado) [‡]	% infectado (N° individuos infectados)	% aislado (N° aislados)	% tipificado (N° aislados)	
Triatominos	Mayo 2000	Núcleo	3,9 (357)	43 (14)	83 (6)		
	Octubre 2000*	Núcleo	3,6 (138)	nd	nd		
	Octubre 2002	Núcleo	0,8 (390)	67 (3)	100 (2)		
		Periferia	4,1 (923)	76 (37)	100 (29) ^{&}		
	Marzo 2003-marzo 2004		Núcleo	23,4 (47)	100 (11)	82 (11)	
	Abril 2004	Ambas	5,9 (388)	68 (22)	60 (15)		
Perros	Mayo 2000	Núcleo	8,7 (219)	88 (8)	71 (7)		
	Noviembre 2002	Núcleo	4,7 (257)	75 (12)	100 (9)		
	Marzo -julio 2003	Periferia	11,8 (221)	90 (21)	100 (19)		
Gatos	Noviembre 2002	Núcleo	2,1 (48)	- #	-		
	Marzo -julio 2003	Periferia	6,6 (61)	100 (4)	100 (4)		
Humanos	Abril 2005-abril 2006	Ambas	5,2 (346)	3,2 (1)*	100 (1)		
	Abril 2007	Núcleo	5,3 (266)	5,9 (1)*	100 (1)		
Mamíferos silvestres	Noviembre 2002- Nov. 2004		Ambas	0,8 (501)	100 (5) [‡]	100 (5)	
	Marzo 2006- Mar 2007		Ambas	1,2 (85)	100 (1)	100 (1)	

[‡] Examinados por microscopio óptico (triatominos), serología (humanos), serología y xenodiagnóstico (perros, gatos y mamíferos silvestres).

Un subgrupo de las viviendas fue evaluado (N = 74).

[&] El linaje de *Trypanosoma cruzi* de un espécimen fue directamente identificado a partir de las heces sin aislamiento.

[#] El aislamiento no se pudo realizar porque todas las vinchucas del xenodiagnóstico resultaron negativas.

* Incluye solamente a pacientes con xenodiagnóstico positivo

[‡] Una comadreja *Didelphis albiventris* fue examinada dos veces en capturas diferentes.

5.3.2 Hemocultivos

En noviembre de 2002 se realizaron hemocultivos a partir de 46 animales potencialmente infectados, de ellos 8 perros y 1 gato resultaron finalmente infectados. Tres hemocultivos (33%) positivizaron y se pudieron criopreservar parásitos de 2 animales ya que no se alcanzaron crecimientos elevados de parásitos por este método.

En el año 2006 se realizaron hemocultivos con medio bifásico a partir de 11 pacientes seropositivos, de los cuales un solo paciente positivizó; y en el 2007 se realizaron hemocultivos a partir de 5 pacientes seropositivos de los cuales ninguno positivizó.

5.3.3 Linajes de *T. cruzi* prevalentes

Tanto el área núcleo como la periférica compartieron todos los linajes identificados (Tabla 5.2). La distribución de linajes entre áreas no fue significativamente diferente ($\chi^2 = 0,1$; grados de libertad (gl) = 1; $P > 0,90$). TCII fue el linaje predominante (89%; N = 99) seguido por el linaje I (TCI) (9%). Se hallaron dos infecciones mixtas con ambos linajes. TCIIe fue el linaje más prevalente dentro de TCII (Tabla 5.2). Los dos linajes parasitarios principales (TCI y TCII) estuvieron asociados significativamente al tipo de hábitat principal (Prueba exacta de Fisher; $P < 0,0001$). Los linajes de TCII predominaron en los hábitats domésticos y peridomésticos (94%; N = 93) mientras que TCI fue hallado en 5 (83%) de los 6 hospedadores infectados del hábitat silvestre. TCII fue hallado en 50 (93%) *T. infestans*, 31 (94%) perros, en los cuatro gatos y en ambos aislados de humanos. TCI fue identificado de muestras provenientes de 3 *T. infestans* y un perro, y como infección mixta con TCII en una *T. infestans* y en un perro (Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Distribución de linajes de *Trypanosoma cruzi* entre hábitats, hospedadores y áreas de estudio en Santiago del Estero, Argentina.

Hábitat	Área	Hospedador	Linajes							Total	
			I	IIc	IIId	IIe	IIb/e	II	I+IIe		
Doméstico	Bajo vigilancia sostenida	Perros		1		12*			1	14	
		Gatos								0	
		Humanos			1					1	
			<i>T. infestans</i>	2			9	6		17	
	Bajo acciones de control por pulsos	Perros		1	2		15	1		19	
		Gatos					4			4	
		Humanos				1				1	
		<i>T. infestans</i>		1	1	1	27	5	1 [‡]	1 [#]	37
	Silvestres		Comadreja	5 [†]							5
			Zorrinos			1					1
		Total	9	5	3	67	12	1	2	99	

* Incluye dos perros con parásitos aislados en el 2000 y en el 2002; TCIIb/e y TCIIe fueron identificados en el 2000 y TCIIe en el 2002.

[‡] El linaje fue directamente identificado a partir heces.

[#] TCI+TCIIb/e.

[†] Los parásitos fueron aislados dos veces del mismo individuo en ocasión de diferentes capturas.

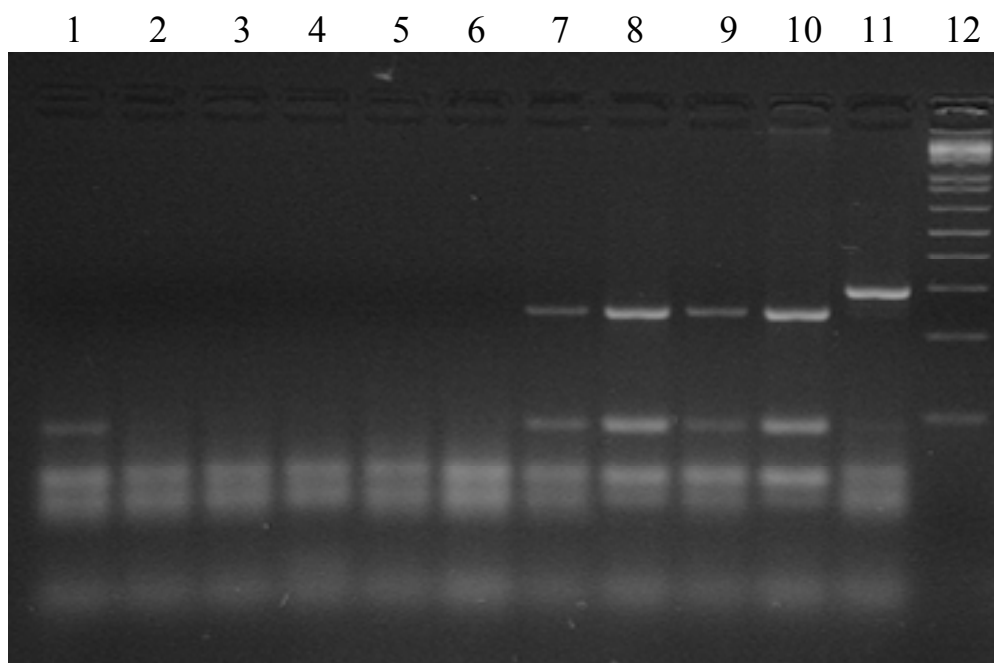
5.3.4 Distribución de linajes de *T. cruzi* por hospedador

La mayoría de las *T. infestans* infectados fueron colectadas en domicilios (67%; N = 54); el hallazgo de ejemplares de esta especie infectados resultó menos frecuente en los depósitos y cocinas peridomiciliarios (22%) y aún menos en los corrales (6%). Tres *T. infestans* adultos infectados, capturados por trampa de luz cerca de un corral de cabras peridoméstico, resultaron TCIIe. En *T. infestans* domésticos o peridomésticos, TCIIe predominó (67%) sobre TCIIb/e (20%) y TCI (6%) (Tabla 5.2). TCIIe estuvo significativamente sobre-representado entre los aislados de este vector ($\chi^2 = 70,1$; gl = 2; $P < 0,0001$). TCIIc, TCIIId y una infección mixta de TCI - TCIIb/e fueron hallados en un ejemplar de *T. infestans* cada uno. La distribución de linajes de *T. cruzi* se apartó significativamente de lo esperado por azar en perros ($\chi^2 = 39,5$; gl = 2; $P < 0,0001$).

Entre los 33 aislados de perros, TCIIe fue el linaje más prevalente (82%), seguido por TCIIc (9%) (Tabla 5.2). TCI y TCIIb/e fueron hallados una vez cada uno (3%), y en un perro TCI ocurrió conjuntamente con TCIIe. Dos perros que fueron re-examinados y cuyos parásitos fueron aislados dos veces (en el 2000 y en el 2002) presentaron TCIIe en ambas ocasiones. Los cuatro gatos estaban infectados con TCIIe, y los dos aislados de humanos resultaron TCIIId (Tabla 5.2).

TCIIc fue hallado en tres perros y en una *T. infestans* (5% de los aislados domésticos) (Tabla 5.2). La figura 5.1 ilustra el patrón de bandas resultante de la corrida por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de los productos de PCR obtenidos para estos aislados. Se observó tanto la ausencia de amplificación del fragmento de 300 o 350 pb de la región intergénica de los genes del mini-exón reportada por Brisse y col. (2001) como la amplificación de la banda de 250 pb reportada para Yeo y col. (2005).

Figura 5.1 Amplificación de la región intergénica de los genes del mini-exón de *Trypanosoma cruzi* con los cebadores TCC y TC 1; calles (1-3) controles negativos de especificidad: (1) M5631, cepa de referencia de TC IIc; (2) CanIII, cepa de referencia de TC IIa; (3) X-10, cepa de referencia de TC I; calles (4-5) controles negativos; calle (6) perros doméstico infectado con TC IIc, sin amplificación (coincidiendo con el patrón de bandas reportados por Brisse y col., 2001); calles (7-10) TC IIc, resultando en el mismo patrón de bandas reportado por Yeo y col., 2005: (7) *T. infestans* peridomésticas; (8-9) perros domésticos; (10) *Conepatus chinga*, zorrino; (11) CL Brener, cepa de referencia de TC IIe; (12) marcador de corrida de 100 pb.



Para evaluar la ocurrencia de una variación de la distribución de linajes de *T. cruzi* entre hospedadores de la misma región se comparan nuestros resultados (2000-2007) con los datos colectados en la provincia de Santiago del Estero a fines de los 1980's (De Luca D'Oro y col. 1993) y en la provincia del Chaco durante 1999-2001 (Diosque y col. 2003) (Tabla 5.3). Dado el bajo número de humanos y comadrejas muestreadas y la homegeneidad de los resultados, para estas especies de hospedadores se agrupan nuestros resultados con los datos obtenidos para el Chaco y los comparamos con los datos publicados por De Luca D'Oro y col. (1993). Se encontraron diferencias significativas para los humanos (Prueba exacta de Fisher; $P = 0,046$) pero no para las comadrejas ($P = 0,26$). Comparando los datos más recientes de Santiago del Estero y el Chaco, la distribución de linajes de *T. cruzi* difirió significativamente entre ambos estudios para *T. infestans* (TCI, TCIIId y TCIIe; $\chi^2 = 22,7$; gl = 2; $P < 0,0001$) pero no para los perros (TCIIe vs los demás linajes; $P = 1,0$).

Tabla 5.3 Variaciones geográficas y temporales de la distribución de los linajes de *Trypanosoma cruzi* entre hospedadores en las provincias de Santiago del Estero y Chaco, Argentina.

Hospedadores	de Luca D'Oro y		Diosque y col., 2003			Este estudio			
	col., 1993*		TCI	TCIIId	TCIIe	TCI	TCIIId	TCIIe	Otros [‡]
Comadrejas	15	3	7			5			
<i>Triatoma infestans</i>		1	7	17	14	3	1	47	3
Humanos	8	7		4			2		
Perros		2	1	1	14	1		28	4
Otros [#]		3						4	1

* Sólo los datos para Santiago del Estero fueron incluidos.

Incluye gatos domésticos, hurones y zorrinos.

‡ Incluye TCIIc, infecciones mixtas de TCI y TCIIe, TCII y TCIIb/e.

5.3.5 Distribución de linajes de *T. cruzi* por vivienda

Con el fin de analizar la distribución de linajes de *T. cruzi* por vivienda, se utilizarán datos de 11 viviendas (marcadas con un asterisco en la Tabla 5.4) donde se identificaron linajes parasitarios de *T. infestans* y al menos un perro o gato. En 9 (82%) de estas viviendas, 35 de 36 vectores y todos los 21 perros y gatos con parásitos aislados tenían el mismo linaje (TCIIe). En la vivienda 1, TCIIe fue identificado no sólo en 6 *T. infestans* domésticos y en el único perro infectado con *T. cruzi* (entre 10 perros examinados para infección) sino también en 3 *T. infestans* adultas dispersantes por vuelo, capturadas por la trampa de luz realizada en el respectivo peridomicilio de la vivienda (Tabla 5.4).

En el área núcleo bajo vigilancia vectorial sostenida, TCIIc fue sólo hallado en un perro de 10 años de edad que ya había sido hallado seropositivo para *T. cruzi* antes de la campaña de rociado masivo con insecticidas en 1992. En el área bajo acciones de control por pulsos, TCIIc fue hallado en un adulto de *T. infestans* colectado en un depósito donde empollaban gallinas (en una vivienda sin perros y gatos domésticos), y en dos perros de 5 y 7 años de edad que habitaban las viviendas 19 y 20 del mismo poblado y que eran hijos de la misma perra (muerta al momento de realización de la campaña) (Tabla 5.4).

En el área bajo vigilancia vectorial sostenida, TCI fue identificado en dos adultos de *T. infestans* (de 97 vinchucas examinadas para infección) capturados en los peridomicilios de las viviendas 8 y 9 donde no se pudieron hallar fuentes potenciales de TCI de origen doméstico entre 14 perros y gatos examinados; sólo se hallaron tres personas adultas seropositivas (de 17 que se estudiaron por serología) que residían permanentemente en esas viviendas (Tabla 5.4). TCI fue también identificado (como infección mixta con TCIIe) en un perro de 12 años de edad que había sido hallado seropositivo para *T. cruzi* antes de la campaña de rociados de 1992 (Tabla 5.4). En el área bajo acciones de control por pulsos, TCI fue hallado en dos adultos de *T. infestans* intradomiciliarios capturados en las viviendas 17 y 14, y en un perro de 2 años de edad que habitaba la vivienda 22, donde no se colectó ningún ejemplar de *T. infestans* en abril del 2004 (Tabla 5.4). En la vivienda 17, un perro infectado con TCIIe fue hallado en 2003 y un año más tarde se colectó un ejemplar de *T. infestans* infectado con TCIIe. En la vivienda 14, una hembra de *T. infestans* fue hallada con una infección mixta de TCI y TCIIb/e (probablemente TCIIe), mientras que no se halló ninguna posible fuente doméstica del TCI entre 4 perros y gatos infectados con TCIIe.

Tabla 5.4 Distribución por vivienda de los linajes de *Trypanosoma cruzi* en humanos, perros domésticos, gatos y *Triatoma infestans* durante 2000-2007, Santiago del Estero, Argentina. Los números entre paréntesis son individuos infectados con cada uno de los linajes nombrados. nd = no examinado para infección; ne = vivienda no evaluada para infestación; ni = no aislado (i.e., el aislamiento no pudo conseguirse a partir de un animal infectado o seropositivo). Los asteriscos marcan las 11 viviendas a las que se refiere el texto.

Área	Vivienda	<i>Triatoma infestans</i>		Perros	
		Linaje de <i>T. cruzi</i>	N° infectado/ N° examinado	Linaje de <i>T. cruzi</i>	N° infectado/ N° examinado
Bajo vigilancia sostenida	1 ^{*‡}	TCIIe (9) [#]	11/41	TCIIe (1)	1/10
	2 [*]	TCIIe (1)	5/12	TCIIe (2)	2/4
	3 [*]	TCIIe (3)	13/77	TCIIe (3)	7/9
	4		0/43	TCIIe (1)	2/5
	5		0/1	TCIIe (1)	1/4
	6		0/1	TCI + TCIIe (1)	2/8
	7		0/1	TCIIc (1)	2/5
	8	TCI (1)	1/37		0/7
	9	TCI (1)	2/60		0/6
	10		-	TCIIe (1)	1/3
	11	TCIIb/e (1)	1/24	ni	1/7
Bajo acciones de control por pulsos	12 ^{*‡}	TCIIe (4)	4/13	TCIIe (3)	3/5
	13 ^{*&}	TCIIb/e (1)	2/44	TCIIe (2)	2/4
	14 ^{*&}	TCI+TCIIb/e (1), TCIIe (4)	12/30	TCIIe (3)	3/3
	15 [*]	TCIIe (10)	12/19	TCIIe (1)	2/4
	16 [*]	TCIIe (1)	1/3	TCIIb/e (1)	1/4
	17 [*]	TCI (1), TCIIe (1)	3/43	TCIIe (1)	2/3
	18 [*]	TCIIId (1)	2/5	TCIIe (2)	2/3
	19 [*]	TCIIe (4)	6/48	TCIIc (1)	3/4
	20 [‡]		2/15	TCIIc (1)	1/3
	21		0/5	TCIIe (1)	1/3
	22		ne	TCI (1)	1/2
	23		-	TCIIe (1)	1/1
	24	TCIIe (1)	1/16	ni	1/2
	25		0/1	TCIIe (1)	1/3
	26	TCIIb/e (1)	2/6		0/1
	27	TCIIc (1)	1/3		0/3
28	TCII (1)	1/6		0/2	
29	TCIIe (1)	3/5		nd	
30	TCIIe (1)	1/5		nd	
31	TCIIe (2)	2/33		nd	
32	TCIIe (1)	1/32		nd	

TCIIe fue identificado en tres *T. infestans* dispersantes capturadas por trampa de luz en el peridomicilio así como también en 6 ejemplares domésticos.

‡ TCIIe fue identificado en dos gatos infectados de esta vivienda.

& TCIIe fue identificado en el único gato infectado de esta vivienda.

‡ TCIIId fue identificado en un residente seropositivo de la vivienda.

5.3.6 Infectividad al vector

La infectividad de los humanos seropositivos y con xenodiagnóstico positivo a los insectos empleados para el mismo fue de 6,7% en el 2006 (N = 30 ninfas examinadas) y 2,5% (N = 40) en el 2007, respectivamente, y no difirió significativamente entre estudios a pesar de haberse empleado distintos tipos de xenodiagnóstico (Prueba exacta de Fisher; $P > 0,5$). Una infectividad mayor fue registrada para los gatos (50,0%; N = 38 ninfas examinadas) y para los perros (54,4%; N = 612). La infectividad a las *T. infestans* de xenodiagnóstico de los perros seropositivos infecciosos no estuvo significativamente asociada con el linaje parasitario ni con la edad del perro (Wald $\chi^2 = 2,6$; gl = 3; número de observaciones = 533; $P > 0,5$).

5.4. Discusión

5.4.1 Los perros y gatos como principales reservorios domésticos

Este es el primer estudio donde un considerable número de aislados de *T. cruzi* obtenidos de diferentes vectores y especies de hospedadores de la misma vivienda se caracterizan mediante métodos de biología molecular. La distribución por vivienda de los linajes de *T. cruzi* mostró que los *T. infestans*, perros y gatos de una determinada vivienda comparten el mismo linaje parasitario en la mayoría de los casos. Basado en evidencia molecular, este resultado da mayor respaldo a la importancia de los perros y gatos como hospedadores domésticos reservorios de *T. cruzi* dada su elevada infectividad y frecuentes contactos con los *T. infestans* domésticos (Cardinal y col., 2007; Gürtler y col., 2007a, b; ver capítulo 2 y 3). Las viviendas que albergaban perros o gatos infectados tenían un mayor riesgo de transmisión (Cohen y Gürtler, 2001; Gürtler y col., 2005, 2007a), pero faltaba evidencia molecular que relacionase los vectores y estas especies hospedadoras al nivel de la vivienda.

En un estudio similar en la provincia del Chaco, se hallaron diferentes linajes infectando perros y humanos (Diosque y col., 2003). Este patrón fue explicado principalmente

por la selección de cepas por los hospedadores, pero la co-ocurrencia de los linajes parasitarios al nivel de la vivienda no fue evaluada en ese estudio. Adicionalmente sugirieron que el rol de los perros en la transmisión doméstica podría ser altamente dependiente de los linajes circulantes. En contraposición, en nuestro estudio observamos una elevada infectividad de los perros seropositivos y ésta no se halló asociada a los linaje parasitarios (Capítulo anterior). Este resultado nos permite afirmar que los perros son importantes fuentes de parásitos para los vectores domésticos independientemente del linaje parasitario por el que se hallan infectados. La vivienda es donde la transmisión doméstica de *T. cruzi* por *T. infestans* es más intensa (Cohen y Gürtler, 2001). Este estudio provee evidencia molecular de que las habitaciones humanas también pueden ser fuentes de *T. infestans* infectados con TCIIe, dispersándose por vuelo hacia los sitios peridomésticos y más allá de ellos (Vazquez-Prokopec y col., 2006). Más estudios combinando métodos serológicos, parasitológicos y moleculares al nivel de la vivienda son esenciales para un mejor entendimiento de la dinámica de transmisión de *T. cruzi*.

Evolutivamente este patrón de linajes compartidos al nivel de la vivienda podría surgir si cepas recombinantes en humanos (i.e., aquellas que podrían surgir de intercambio genético durante la selección por drogas en el hospedador humano) tuviesen una mayor capacidad para propagarse dentro de la vivienda dada la estrecha proximidad de otros miembros de la familia, *T. infestans* y otros animales domésticos de la vivienda. De hecho, al menos cinco personas de las viviendas del área bajo supervisión sostenida recibieron tratamiento etiológico y una de ellas no lo terminó.

5.4.2 Distribución de linajes por hospedador

La distribución global de los linajes de *T. cruzi* entre los vectores y los hospedadores reservorios fue similar en las dos áreas rurales vecinas con diferente historia de control vectorial e intensidad de transmisión. TCII predominó en los hábitats domésticos y TCI en los ecotopos silvestres. En coincidencia con nuestros hallazgos, TCIIe y TCI fueron respectivamente los linajes predominantes tipificados por EEML en hábitats doméstico y silvestres, en un área rural endémica de la provincia del Chaco ubicado a unos 150 km. al noreste de nuestra área de estudio (Diosque y col. 2003). En discrepancia con nuestros resultados, TCIIId predominó en los *T. infestans* de la provincia del Chaco. La predominancia del linaje I entre los aislados del hábitat silvestre probablemente se deba al rol de las comadrejas como el principal reservorio de *T. cruzi* silvestre local (Wisnivesky-Colli y col., 1992; Schweigmann y col. 1999) y a la ausencia de infección por *T. cruzi* entre armadillos.

Las comadrejas, consistentemente, han sido halladas infectadas casi exclusivamente con linaje I en de la región chaqueña y en las Américas (Barnabé y col., 2000; Ceballos y col., 2006; Diosque y col., 2003; Wisnivesky-Colli y col., 1992; Yeo y col., 2005). Los armadillos, especialmente *Dasyopus novemcinctus*, son hospedadores silvestre de *T. cruzi* II en el Chaco Paraguayo (Yeo y col., 2005) pero son extremadamente raros en nuestra área de estudio. La ausencia de infección por *T. cruzi* en las demás especies de armadillos examinadas, explica aún más el patrón observado.

En el área núcleo bajo vigilancia vectorial sostenida, la mitad de los perros infectados ya habían sido hallados infectado antes de la campaña de rociados masivos con insecticidas realizada en 1992. Por lo tanto, los aislados de *T. cruzi* provenientes de ellos (TCI, TCIIc y TcIIe) probablemente representen las cepas de parásitos que circulaban una década antes y cuyos hospedadores lograron sobrevivir. Por el contrario, los parásitos de perros nativos, nacidos luego de la campaña de rociados con insecticidas y con residencia estable en el área núcleo, representarían las cepas actualmente circulantes en el área. La totalidad de estos 5 perros fueron hallados infectados con TCIIe, y cuatro de ellos son compatibles con infecciones adquiridas verticalmente (Cardinal y col., 2006; ver capítulo II). Coincidentemente, TCIIe fue también el linaje predominante en las *T. infestans* del área núcleo.

5.4.3 Los linajes parasitarios de humanos

El linaje TCIIId (o su zimodema equivalente) predominaba entre los aislados de humanos de las provincias de Santiago del Estero y Chaco y en un amplio grupo de aislados humanos de Argentina y Bolivia (Brenière y col., 2002; Burgos y col., 2007; Diosque y col., 2003; Montamat y col., 1992). TCIIId fue también frecuentemente identificado en aislados humanos del Paraguay (Chapman y col., 1984), y fue el linaje prevalente detectado en muestras de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Chagas congénito en Argentina (Burgos y col., 2007). Más aún, TCIIId ha sido hallado en sangre periférica de pacientes con enfermedad de Chagas y SIDA, mientras que otros linajes como TCIIb y TCIIe fueron hallados en el corazón, cerebro y lesiones de la piel de esos mismos pacientes (Burgos y col., 2006, 2007; Schijman y col., datos no publicados). En nuestro estudio, los dos aislados de humanos fueron identificados como TCIIId. Dado que las poblaciones naturales de *T. cruzi* desarrollan diferentes tropismos tisulares en los hospedadores mamíferos (Macedo y col., 2004; Burgos y col., 2005, 2008) no podemos rechazar la posibilidad de que TCIIe pueda

causar también infección y enfermedad en humanos, aunque desplegando menores grados de parasitemia no detectables por xenodiagnóstico.

Fue particularmente difícil obtener aislados de *T. cruzi* a partir de humanos seropositivos, muy probablemente debido a que las infecciones crónicas en adultos se caracterizan por tener muy bajas parasitemias, y a partir de triatomos muertos (que frecuentemente resultaban en contaminaciones). En este trabajo hallamos un muy bajo porcentaje de xenodiagnósticos positivos entre humanos seropositivos, pero no entre los perros seropositivos examinados simultáneamente. Los parásitos de humanos fueron obtenidos en el 2006 por xenodiagnóstico natural (directo) y en el 2007 mediante xenodiagnóstico artificial. Ni la tasa de xenodiagnósticos positivos ni la infectividad a los triatomos empleados en el xenodiagnóstico difirió significativamente entre el 2006 y el 2007 a pesar de las diferencias metodológicas empleadas. En un estudio serológico y con xenodiagnóstico realizado previamente en el área Amamá a comienzos de los 1990s con los mismos procedimientos aquí usados, se mostró que sólo el 29,3% de los humanos seropositivos tenían xenodiagnóstico positivo, y la infectividad al vector era muy baja en promedio (~3%) (Gürtler y col., 1996). En nuestro estudio previo y en otros (por ej., Hoff y col., 1979) conducidos en poblaciones humanas bien definidas y no seleccionadas, la proporción de personas seropositivas con parasitemia detectable declinó con la edad. Por lo tanto, la baja tasa de xenodiagnósticos positivos entre humanos registrada en nuestro estudio reciente podría deberse a la ausencia de niños y adolescentes seropositivos entre los estudiados (rango de los pacientes estudiados, 21-79 años de edad). La tasa global de xenodiagnósticos positivos para humanos seropositivos sería 13,3% (2/15) y estaría cercana a la estimación previa para la misma clase de edad (15,2%) realizada a comienzos de los 1990s (Gürtler y col., 1996).

5.4.4 Los ciclos de transmisión doméstico y silvestre

Estudios previos basados en la EEML permitieron concluir que los ciclos domésticos y silvestres de transmisión de *T. cruzi* se solapaban parcialmente en Argentina, incluyendo áreas rurales dentro de la región Chaqueña (Wisnivesky-Colli y col., 1992; De Luca d'Oro y col., 1993; Diosque y col., 2003). A fines de los 1980s, cuando la intensa transmisión doméstica de *T. cruzi* era intensa y generalizada, algunos mamíferos silvestres (comadreja, hurones y zorrinos) se hallaron infectados con TCIId aisladamente, linaje que también infectaba perros domésticos y *T. infestans* en Santiago del Estero (Wisnivesky-Colli y col., 1992; De Luca d'Oro y col., 1993). En ese contexto epidemiológico de intensa transmisión, la distribución

observada de linajes probablemente fuera un derramamiento (“spillover”) de cepas de parásitos desde el hábitat doméstico hacia el silvestre. Este fenómeno también ha sido observado en el Brasil (Diotaiuti y col., 1995).

En Argentina, esta es la primera vez que TCIIC ha sido aislado de perros domésticos y *T. infestans* naturalmente infectados. El actual hallazgo de linajes frecuentemente asociados con el medio silvestre en el Gran Chaco (i.e., TCI y TCIIC) en vectores y hospedadores reservorios domésticos de las áreas núcleo y periférica brinda aún más apoyo la existencia de un solapamiento marginal de los ciclos de transmisión, aunque en un contexto epidemiológico diferente donde la transmisión se encuentra mucho más deprimida. La introducción de parásitos silvestres hacia el ambiente doméstico podría darse a través de diversos mecanismos como por ejemplo: triatomínicos y mamíferos silvestres invadiendo ecotopos artificiales, y mamíferos sinantrópicos (i.e., ratas, ratones, perros y gatos domésticos) o las personas mismas visitando focos naturales (Barreto, 1975; Diotaiuti y col., 1995). Las comadrejas frecuentemente se aproximan a las habitaciones humanas y podrían servir como hospedadores “puente” entre el ambiente silvestre y el doméstico (Diotaiuti y col., 1995, Schweigmann y col., 1999). Sin embargo, dada la abrupta declinación en la abundancia y prevalencia de *T. cruzi* en comadrejas en nuestra área de estudio (Ceballos y col., 2006), este tipo de introducción parecería muy improbable en el presente. Si las comadrejas adquiriesen la infección por *T. cruzi* a partir de fuentes domésticas, otros linajes parasitarios distintos de TCI deberían infectarlas, tal como se observó en el pasado (Wisnivesky-Colli y col. 1992; De Luca d’Oro y col. 1993). El sorprendente hallazgo de una comadreja infectada con TCI en el 2007, cuando la abundancia de *T. infestans* domésticos y peridomésticos era muy baja o nula y ninguna infección por *T. cruzi* se había detectado en triatomínicos desde el rociado con insecticidas en el 2004 (Gürtler y col., 2007b), sugiere aún más la ocurrencia de un ciclo de transmisión silvestre independiente en el área (a muy bajo nivel intensidad).

El probable vector silvestre de *T. cruzi* en la Argentina aún no ha sido identificado (Ceballos y col., 2006), y *T. infestans* ha sido la única especie hallada infectada con *T. cruzi* en nuestra área de estudio durante una década post-intervención (Gürtler y col., 2007b; Marcet y col., 2006; Schijman y col., 2006). Sin embargo, el reciente hallazgo de colonias silvestres de *T. infestans* (Ceballos y col., datos no publicados) y la colección de *T. infestans* infectados con *T. cruzi* por trampa de luz (Vazquez-Prokopec y col., 2006) sugieren la posibilidad de que se introduzcan parásitos a través de la dispersión por vuelo de estos triatomínicos. Aunque en el presente los ejemplares de *T. infestans* de las colonias silvestres se hallaron no infectados, a fines de 1980s, Wisnivesky-Colli y col (1992) estudiando la

infestación de las madrigueras de comadrejas del área núcleo, hallaron un macho de *T. infestans* infectado por *T. cruzi* junto con dos ninfas de *T. sordida* no infectadas. Los *T. infestans* infectados dispersantes provenientes de colonias silvestres podrían dar cuenta de los cinco ejemplares adultos hallados infectados con TCI o TCIIc en viviendas donde no se detectaron posibles fuentes domésticas de esos linajes. Son necesarios más aislados de humanos de las viviendas estudiadas para poder evaluar su eventual contribución como fuentes de TCI o TCIIc. Estudios futuros sobre el perfil alimentario de los *T. infestans* infectados permitiría vislumbrar las posibles fuentes de infección.

Los perros, gatos y roedores podrían mediar la introducción de linajes de *T. cruzi* silvestres al ambiente doméstico. Aunque los gatos del área de estudio comúnmente frecuentan el monte (Cardinal y col., 2006, ver capítulos II y II), su actual contribución a esta introducción parecería despreciable ya que los pocos gatos hallados infectados lo estaban con TCIIe. Más aún, de entre 163 roedores examinados para infección por *T. cruzi* durante 2002-2007 no se halló ningún ejemplar infectado (Ceballos y col., 2006; este estudio), a pesar que las infecciones en roedores son comunes en Bolivia, Chile y Brasil (Cortez y col., 2006, Herrera y col., 2007; Rozas y col., 2007). Los perros podrían infectarse con TCI o TCIIc al internarse en el monte o cazar, ya que los perros matan comadrejas en el área de estudio (Schweigmann y col., 1999). En el área núcleo, los dos perros infectados con TCI o TCIIc ya habían sido hallados infectados antes de 1992, cuando ocurría intensa transmisión de *T. cruzi* y los ciclos de transmisión se solapaban de alguna manera. En el área periférica, los tres perros infectados con TCI o TCIIc eran cazadores, lo que podría sugerir una posible ruta oral de la infección, pero este mecanismo de transmisión es improbable que suceda dado la muy baja prevalencia actual de *T. cruzi* en mamíferos silvestres (0,8%).

5.4.5 Limitaciones del estudio

La distribución de linajes de *T. cruzi* entre vectores y hospedadores debe interpretarse con cautela ya que diversas características biológicas de las cepas, como la selección diferencial del hospedador, histotropismo, y la selección de linajes durante el cultivo del parásito, podrían estar afectando los patrones observados. Nuestros resultados podrían estar sesgados por el hecho de no haber trabajado con clones ya que existe evidencia de infecciones mixtas con dos linajes sólo reveladas cuando se tipifican los clones (Montamat y col., 1992, Yeo y col., 2005, 2007). El pasaje por cultivo de los parásitos analizados también podría haber reducido la actual variabilidad genética existente en las poblaciones naturales de *T. cruzi* ya que se ha documentado una mayor diversidad cuando los parásitos se tipifican

directamente de las muestras de heces (Bosseno y col., 1996; Marcet y col., 2006) o de otro tipo de muestras clínicas (Burgos y col., 2007, 2008). Los individuos residentes no examinados para la infección o aquellos que desaparecieron justo antes de las campañas podrían haber contribuido a la distribución de linajes por vivienda observada de una manera desconocida.

En este estudio incluimos la dimensión espacial de manera implícita. Para proseguir en el estudio de la distribución espacial de los animales infectados y sus linajes parasitarios, deberíamos incorporar la información aquí compilada en un sistema de información geográfica (GIS). De esta manera podríamos aplicar distintas herramientas propias de la estadística espacial para integrar las dimensiones espacial y temporal con el fin de describir, comprender y predecir el riesgo potencial de transmisión de *T. cruzi*.

5.5 Conclusiones

Los ciclos doméstico y silvestre de transmisión de *T. cruzi* se solapaban en nuestra área de estudio a fines de los 1980s y aún se solapan en el área, aunque de una manera marginal. La introducción de *T. cruzi* desde los hábitats silvestres hacia los domésticos ocurriría muy raramente en el actual contexto epidemiológico.

En base a la evidencia provista por la identificación molecular de los linajes, el rol de los perros domésticos como principales reservorios domésticos de *T. cruzi* en la región del Chaco se refuerza. Para lograr un mejor control durante la vigilancia, los programas de control de la transmisión de *T. cruzi* deberían considerar la incorporación de estrategias para prevenir los contactos entre perro infectado-vector, como por ejemplo la colocación de collares impregnados con insecticidas a los animales infectados, tratamiento con drogas parasiticidas, o realización de rociados con insecticidas especialmente dirigidos a las viviendas que albergan animales infectados.

Capítulo VI

Conclusiones e implicancias para el control

El presente trabajo de Tesis representa una contribución al conocimiento de los ciclos de transmisión de *T. cruzi* en comunidades rurales del Chaco Argentino y en particular a los efectos de las acciones de control vectorial sobre la transmisión del parásito en el ciclo doméstico.

Utilizando los perros domésticos como centinelas de la transmisión evaluamos el impacto a largo plazo de rociados selectivos realizados por la propia comunidad luego de un rociado masivo con insecticidas piretroides sobre la transmisión de *T. cruzi* en comunidades rurales bajo vigilancia entomológica entre 1992 y 2002 y demostramos una marcada declinación de la prevalencia y la incidencia de infección en perros y gatos. La vigilancia vectorial con participación comunitaria y sostenida en el tiempo fue efectiva en la disminución de la transmisión de *T. cruzi* pero no en la eliminación de *T. infestans*, como lo demuestran las infestaciones leves pero persistentes detectadas principalmente en las estructuras peridomiciliarias.

La utilización de los perros como centinelas de la transmisión doméstica y peridoméstica fue una herramienta eficaz para lograr el seguimiento de la circulación del parásito en el ciclo doméstico, a la vez que permitiría evitar el tamizaje frecuente de las poblaciones humanas para evaluar el impacto de las acciones de control sobre la transmisión.

El hallazgo de infecciones en perros y gatos asociadas a niveles de abundancia de *T. infestans* muy bajos y el hallazgo de casos incidentes en niños de la población local (Gürtler y col., 2005) en viviendas con muy baja infestación doméstica indicarían que para lograr la interrupción de la transmisión doméstica de *T. cruzi* en áreas rurales altamente endémicas se requiere de tolerancia CERO a las infestaciones leves por triatominos.

Al comparar el impacto relativo de dos estrategias de control vectorial comunitarias sobre la infestación por *T. infestans* y la infección por *T. cruzi* en dos áreas rurales vecinas demostramos la ocurrencia de transmisión activa de *T. cruzi* en poblados bajo acciones de control vectorial por pulsos, no supervisadas, comunitarias, operando bajo los lineamientos del PNCV durante una década, pero no en poblados vecinos que se hallaban bajo vigilancia vectorial comunitaria, sostenida y supervisada durante el mismo periodo de tiempo. Esto demuestra la necesidad de realizar las acciones de control vectorial de manera planificada, sostenida en el tiempo, asegurando una adecuada supervisión y contigüidad espacial.

El hallazgo de agregación de la infección por *T. cruzi* al nivel de la vivienda en perros y gatos tiene implicancias directas en la planificación de las acciones de control necesarias para interrumpir la transmisión vectorial, ya que al aumentar el número de reproducción básico (R_0) de la infección resultaría necesaria una mayor intensidad de las acciones de

control. La incorporación de esta heterogeneidad en la planificación permitiría priorizar las actividades de control en las viviendas “claves” que concentran los hospedadores reservorios infectados ya que allí las vinchucas tienen mayores probabilidades de infectarse y disparar la transmisión local. Esta aproximación permitiría una estratificación de la comunidad, identificándose las viviendas con alto riesgo de transmisión vectorial, y la implementación de estrategias focalizadas en ellas, lo que redundaría en un incremento de la efectividad de las acciones de control.

Para áreas de alto riesgo como las del Gran Chaco, interrumpir la transmisión vectorial doméstica de *T. cruzi* requiere rociados con insecticidas residuales más intensos, de mejor calidad, sostenidos en el tiempo y combinados con la participación comunitaria, vigilancia vectorial sostenida y permanente y medidas de manejo ambiental.

La fácil realización y elevadas sensibilidad y especificidad halladas para la prueba rápida inmunocromatográfica hacen de esta prueba una excelente candidata para el procesamiento de grandes cantidades de muestras, como el tamizaje de sueros a campo.

Con la aproximación de la epidemiología molecular hemos podido profundizar en el conocimiento de la inter-relación de los ciclos de transmisión de *T. cruzi* y hallamos que los ciclos domésticos y silvestres se solapaban en el área de estudio a fines de los 1980s, cuando ocurría intensa transmisión doméstica, y aún se solapan marginalmente en el presente. Resulta necesario realizar más estudios epidemiológicos-moleculares en comunidades rurales del noroeste argentino para poder evaluar la inter-relación de los ciclos en el presente, y el potencial efecto de la introducción de *T. cruzi* desde los hábitats silvestres a los domésticos.

Mediante la integración de los datos epidemiológicos y los resultados de identificación de linajes mediante biología molecular hemos reforzado la evidencia a favor de la importancia de los perros y gatos como reservorios domésticos de *T. cruzi*. La permanencia en el sistema de perros infectados e infecciosos por más de 10 años (es decir, los individuos hallados infectados pre-rociado) ejemplifican el riesgo que conllevan para las personas que cohabitan con ellos. Especialmente para las áreas donde *T. infestans* es el principal vector domiciliario, resulta necesario diseñar medidas de profilaxis adecuadas para disminuir el contacto de estos reservorios con los vectores. Son necesarias campañas educativas donde se incentive la detección temprana de la reinfestación doméstica, se desaliente el hábito de permitir que los perros y gatos duerman en el interior de las habitaciones o en las cercanías de las mismas, y se desaconseje el traslado de perros desde lugares sin rociar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Affranchino, J.L., Ibañez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., Aslund, L., Pettersson, U., Frasc, A.C., 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 221-228.
- Albarracin-Veizaga, H., de Carvalho, M.E., Nascimento, E.M., Rodrigues, V.L., Casanova, C., Barata, J.M., 1999. Chagas disease in an area of recent occupation in Cochabamba, Bolivia. *Rev. Saude Publica* 33, 230-236.
- Alencar, J.E., Almeida, Y.M., Santos, A.R., Freitas, L.M., 1974/1975. Epidemiology of Chagas' Disease in the State of Ceará, Brazil, IV. The role of dogs and cats as domestic reservoirs. *Rev Bras de Malariologia e Doenças Trop.*, 26/27, 5-26.
- Anónimo, 1991. *Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards*. Washington, DC: National Academy Press.
- Anónimo, 1998. Normas Nacionales e Internacionales de Laboratorio para la Enfermedad de Chagas. Tratado Conosur OPS/OMS. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación.
- Araújo, F.M.G., Bahia, M.T., Magalhães, N.M., Martins-Filho, O.A., Veloso, V.M., Carneiro, C.M., Tafuri, W.L., Lana, M., 2002. Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Trop.* 81, 21-31.
- Atwood, J.A. 3rd, Weatherly, D.B., Minning, T.A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F.R., Orlando, R., Tarleton, R.L., 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, 309, 473-476.
- Bar, M.E., Alvarez, B.M., Oscherov, E.B., Damborsky, M.P., Jörg, M., 1999. Contribución al conocimiento de los reservorios del *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) en la provincia de Corrientes, Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32, 271-276.
- Barnabé, C., Brissé, S., Tibayrenc, M., 2000. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* 120, 513-526.
- Barr, S.C., Dennis, V.A., Klei, T.R., 1991. Serologic and blood culture survey of *Trypanosoma cruzi* infection in four canine populations of southern Louisiana. *Am. J. Vet. Res.* 4, 570-573.

- Barreto, M.P., 1975. Possible role of wild mammals and triatomines in the transmission of *Trypanosoma cruzi* to man. *En: New Approaches in American Trypanosomiasis Research*. Washington, PAHO/WHO, (Scientific Publication n° 318) pp. 307-318.
- Basombrio, M.A., Segura, M.A., Mora, M.C., Gomez, L., 1993. Field trial of vaccination against american trypanosomiasis (Chagas'disease) in dogs *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 143-151.
- Basso, B., Eraso, A., Moretti, E., Albesa, I., Kravetz, F.O., 1977. Infección natural de *Calomys musculus* (Rodentia, Cricetidae) por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Asoc. Argent. Microbiol.* 9, 11-16.
- Basso, B., Moretti, E.R., Albesa, I., Eraso, A.J., Kravetz, F.O., D'Alessandro, A., 1982. Infección natural de *Akodon dolores*, Thomas, 1916 (Rodentia, Cricetidae) por el *Trypanosoma cruzi*. *Rev. de Med Trop de Sao Paulo*, 24, 21-26.
- Bosompem, K.M., Ayi, I., Anyan, W.K., Arishima, T., Nkrumah, F.K., Kojima, S., 1997. A monoclonal antibody-based dipstick assay for diagnosis of urinary schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 554-6.
- Bosseno, M.F., Telleria, J., Vargas, F., Yaksic, N., Noireau, F., Morin, A., Brenière, S.F., 1996. *Trypanosoma cruzi*: Study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Experim. Parasitol.* 83, 275-282.
- Bowman, N.M., Kawai, V., Levy, M.Z., Cornejo del Carpio, J.G., Cabrera, L., Delgado, F., Malaga, F., Cordova Benzaquen, E., Pinedo, V.V., Steurer, F., Seitz, A.E., Gilman, R.H., Bern, C., 2008. Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1822-1828.
- Brenière, S.F., Bosseno, M.F., Noireau, F., Yaksic, N., Liegeard, P., Aznar, C., Hontebeyrie, M., 2002. Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 289-295.
- Briceño-León, R., 1990. *La casa enferma*. Fondo Editorial Acta Científica de Venezuela y Consorcio de Ediciones Capriles, Caracas, Venezuela, 149 págs.
- Briceño-León, R., 2003. Las ciencias sociales y la salud: un diverso y mutante campo teórico. *Ciencia y Saúde Coletiva* 8, 33-45.

- Brisse, S., Verhoef, J., Tibayrenc, M., 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.* 31, 1218-1226.
- Brutus, L., Schneider, D., Postigo, J., Romero, M., Santalla, J., Chippaux, J.P., 2008. Congenital Chagas disease: Diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Trop.* 106, 195-199.
- Bryan, R.T., Balderrama, F., Tonn, R.J., Pinto Dias, J.C., 1994. Community participation in vector control: lessons from Chagas' Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 61-71.
- Burgos, J.M., Begher, S.B., Freitas, J.M., Bisio, M., Duffy, T., Altcheh, J., Teijeiro, R., Lopez Alcoba, H., Deccarlini, F., Freilij, H., Levin, M.J., Levalle, J., Macedo, A.M., Schijman A.G., 2005. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 1016-1018.
- Burgos, J.M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H.M., Seidenstein, M.E., Piccinali, R., Freitas, J.M., Levin, M.J., Macchi, L., Macedo, A.M., Freilij, H., Schijman, A.G., 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 37, 1319-1327.
- Burgos, J.M., Begher, S., Valadares Silva, H., Bisio, M., Duffy, T., Levin, M.J., Macedo, A.M., Schijman, A.G., 2008. Case report: Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 294-297.
- Carcavallo, R.U., Martinez, A., 1968. Entomoepidemiología de la República Argentina. *Investigaciones Científicas de las Fuerzas Armadas Argentinas* 1, 76-92.
- Cardinal, M.V., Castañera, M.B., Lauricella, M.A., Cecere, M.C., Ceballos, L.A., Vazquez-Prokopec, G.M., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2006a. A prospective study of the effects of sustained vector surveillance on *Trypanosoma cruzi* infection of dogs and cats in rural northwestern Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 753-761.
- Cardinal, M.V., Reithinger, R., Gürtler, R.E.; 2006b. Use of an immunochromatographic dipstick test for rapid detection of *Trypanosoma cruzi* in sera from animal reservoir hosts. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3005-3007.

- Cardinal, M.V., Lauricella, M.A., Marcet, P.L., Orozco, M.M., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2007. Impact of community-based vector control on house infestation and *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans*, dogs and cats in the Argentine Chaco. *Acta Trop.* 103, 201–211.
- Castañera, M.B., 1999. Contribución de los perros a la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en un área rural de Argentina: demografía, rol centinela y modelado matemático. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina, 215 pp.
- Castañera, M.B., Lauricella, M.A., Chuit, R., Gürtler, R.E., 1998. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92, 671-683.
- Catalá, S., Crocco, L., Muñoz, A., Morales, G., Paulone, I., Giraldez, E., Candioti, C., Ripol, C., 2004. Entomological aspects of Chagas' disease transmission in the domestic habitat, Argentina. *Rev Saúde Pública* 38, 216-222.
- Ceballos, L.A., Vazquez-Prokopec, G.M., Cecere, M.C., Marcet, P.L., Gürtler, R.E., 2005. Feeding rates, nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Trop.* 95, 149-159.
- Ceballos, L.A., Cardinal, M.V., Vazquez-Prokopec, G.M., Lauricella, M.A., Orozco, M.M., Cortinas, R., Schijman, A.G., Levin, M.J., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2006. Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta Trop.* 98, 286-296.
- Cecere, M.C., Gürtler, R.E., Chuit, R., Cohen, J.E., 1997. Effects of chickens on the prevalence of infestation and population density of *Triatoma infestans* in rural houses of north- west Argentina. *Med. Vet. Entomol.* 11, 383-388.
- Cecere, M.C., Gürtler, R.E., Chuit, R., Cohen, J.E.; 1998. Factors limiting the domestic density of *Triatoma infestans* in north-west Argentina: a longitudinal study. *Bull. World Health Organ.* 76, 373-384.
- Cecere, M.C., Castañera, M.B., Canale, D.M., Chuit, R., Gürtler, R.E., 1999. *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans* and other triatomines: long-term effects of a control program in rural northwestern Argentina. *Rev. Panam. Salud Pública* 5, 392-399.

- Cecere, M.C., Gürtler, R.E., Canale, D.M., Chuit, R., Cohen, J.E., 2002. Effects of partial housing improvement and insecticide spraying on the reinfestation dynamics of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Trop.* 84, 101-116.
- Cecere, M.C., Vazquez-Prokopec, G.M., Gürtler, R.E., Kitron, U., 2004. Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) during five years following insecticide spraying in a rural community in northwestern Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 803-810.
- Cecere, M.C., Vazquez-Prokopec, G.M., Gürtler, R.E., Kitron, U., 2006. Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1096-1102.
- Cedillos, R.A., Warren, M., Wilton, D.P., Jeffery, G.M., Sauerbrey, M., 1976. Estudios epidemiológicos del *Trypanosoma cruzi* en El Salvador. *Rev Inst Inv Med* 5, 119-131.
- Cerisola, J.A., Rohwedder, R.W., Del Prado, C.E., 1971. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana, utilizando ninfas de diferentes especies de triatominos. *Bol Chile Parasit* 26:57-8.
- Chapman, M.D., Baggaley, R.C., Godfrey-Fausset, P.F., Malpas, T.J., White, G., Canese, J., Miles, M.A., 1984. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J. Protozool.* 31, 482-486.
- Chippaux, J.P., Postigo, J.R., Santalla, J.A., Schneider, D., Brutus, L., 2008. Epidemiological evaluation of Chagas disease in a rural area of southern Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 578-584.
- Cohen JE, Gürtler RE, 2001. Modeling household transmission of American trypanosomiasis. *Science* 293, 694-698.
- Cortez M.R., Pinho, A.P., Cuervo, P., Alfaro, F., Solano, M., Xavier, S.C., D'Andrea, P.S., Fernandes, O., Torrico, F., Noireau, F., Jansen, A.M., 2006. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Exp. Parasitol.* 114, 305-313.
- Crisante, G., Rojas, A., Teixeira, M.M.G., Añez, N., 2006. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop.* 98, 247-254.

- da Silveira, F., 2000. Biología Molecular do *Trypanosoma cruzi*. En: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Brener, Andrade, Barral-Netto (Ed.). Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil. 2ª edición. Pp. 127-152.
- De Luca d'Oro, G.M., Cardenal, C.N., Pret, B., Crisci, J.V., Montamat, E.E., 1993. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. *Parasitology*. 107, 405-410.
- Diosque, P., Barnabé, C., Padilla, A., Marco, J., Cardozo, R., Cimino, R., Nasser, J., Tibayrenc, M., Basombrío, M., 2003. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 33, 997-1003.
- Diosque, P., Padilla, A., Cimino, R.O., Cardozo, R.M., Sanchez Negrette, O., Marco, J.D., Zaca, R., Meza, C., Juarez, A., Rojo, H., Rey, R., Corrales, R.M., Nasser, J.R., Basombrío, M.A., 2004. Chagas' disease in rural areas of Chaco province, Argentina: epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 590-593.
- Diotaiuti, L., Pereira, A.S., Loiola, C.F., Fernandes, A.J., Schofield, C.J., Dujardin, J.P., Pinto Dias, J.C., Chiari, E., 1995. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 443-448.
- dos Santos, A.H., da Silva, I.G., Rassi, A., 1995. A comparative study between natural and artificial xenodiagnosis in chronic Chagas' disease patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 28, 367-373.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S.,

- Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., Andersson, B., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309, 409-415.
- Estrada-Franco, J.G., Bhatia, V., Diaz-Albiter, H., Ochoa-Garcia, L., Barbosa, A., Vazquez-Chagoyan, J.C., Martinez-Perez, M.A., Guzman-Bracho, C., Garg, N., 2006. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 624-630.
- Feliciangeli, M.D., Campbell-Lendrum, D., Martinez, C., Gonzalez, D., Coleman, P., Davies, C., 2003. Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. *Trends Parasitol.* 19, 44-49.
- Fleiss, J. L., 1981. *Statistical methods for rates and proportions*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, N.Y. Pp.212-236.
- Forattini, O.P., da Rocha e Silva, E.O., Rabello, E.X., Rehder de Andrade, J.C., Correia Rodrigues, V.L.C., 1978. Aspectos ecológicos da tripanossomiase americana- XIII Potential enzótico doméstico em area de ocorrência de *Panstrongylus megistus* sob vigilância epidemiológica. *Rev. Saúde Públ. S. Paulo* 12, 417-424.
- Freitas, J.L.P., 1950. Observações sobre xenodiagnósticos practicados em reservatórios domésticos e silvestres do *Trypanosoma cruzi* em uma localidade endêmica da moléstia de Chagas no Estado de São Paulo. *Hospital* 38, 521-529.
- Fujita, O., Sanabria, L., Inchausti, A., De Arias, A.R., Tomizawa, Y., Oku, Y., 1994. Animal reservoirs for *Trypanosoma cruzi* infection in an endemic area in Paraguay. *J Vet Med Sci.* 56, 305-308.
- Gamboa, J.C., 1967. Evaluación de las medidas antitriatomínicas por medio de la prevalencia de *Schizotrypanum cruzi* en perros. *Bol. Inf. Dir. Malariol. San. Amb. (Venezuela)* 7, 321-325.
- Garcia, E.S., de Azambuja, P., 2000. Fisiologia de Triatomíneos: desenvolvimiento, reprodução, e interação com *Trypanosoma cruzi*. *En: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Brener, Andrade, Barral-Netto (Ed.). Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil. 2ª edición, pp. 41-47.
- Gascón, J., Albajar, P., Cañas, E., Flores, M., Gómez i Prat, J., Herrera, R.N., Lafuente, C.A., Luciardi, H.L., Moncayo, A., Molina, L., Muñoz, J., Puente, S., Sanz, G., Treviño, B., Sergio-Salles, X.; Working Group of the second workshop on "Imported Chagas' Disease, a New Challenge in Public Health"; Spanish Society of Tropical Medicine and International Health, 2008. Diagnosis, management and

- treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 26, 99-106.
- Gürtler, R.E., Kravetz, F.O., Petersen, R.M., Lauricella, M.A., Wisnivesky-Colli, C., 1990. The prevalence of *Trypanosoma cruzi* and the demography of dog population after insecticidal spraying of houses: a predictive model. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 84, 313-323.
- Gürtler, R.E., Cecere, M.C., Petersen, R.M., Rubel, D.N., Schweigmann, N.J., 1993. Chagas disease in north- west Argentina: association between *Trypanosoma cruzi* parasitaemia in dogs and cats and infection rates in domestic *Triatoma infestans*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 12-15.
- Gürtler, R.E., Petersen, R.M., Cecere, M.C., Schweigmann, N.J., Chuit, R., Gualtieri, J.M., Wisnivesky- Colli, C., 1994. Chagas disease in north- west Argentina: risk of domestic reinfestation by *Triatoma infestans* after a single community- wide application of deltamethrin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 27-30.
- Gürtler, R.E., Cecere, M.C., Castañera, M.B., Canale, D., Lauricella, M.A., Chuit, R., Cohen, J.E., Segura, E.L., 1996. Probability of infection with *Trypanosoma cruzi* of the vector *Triatoma infestans* fed on infected humans and dogs in Northwest Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 24-31.
- Gürtler, R.E., Cohen, J.E., Cecere, M.C., Chuit, R., 1997. Shifting host choices of the vector of Chagas disease *Triatoma infestans* in relation to the availability of hosts in houses in north-west Argentina. *J. Appl. Ecol.* 34, 699-715.
- Gürtler, R.E., Cohen, J.E., Cecere, M.C., Lauricella, M.A., Chuit, R., Segura, E.L., 1998. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 748-758.
- Gürtler, R.E., Cecere, M.C., Canale, D.M., Castañera, M.B., Chuit, R., Cohen, J.E., 1999. Monitoring house reinfestation by vectors of Chagas disease: a comparative trial of detection methods during a four-year follow-up. *Acta Tropica. Acta Trop.* 72, 213-234.
- Gürtler, R.E., Segura, E.L., Cohen, J.E., 2003. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg. Inf. Dis.* 9, 29-32.
- Gürtler, R.E., Cecere, M.C., Lauricella, M.A., Petersen, R.M., Chuit, R., Segura, E.L., Cohen JE, 2005. Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children

- following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 95-103.
- Gürtler R. E., 2007. Eco-epidemiología regional de la transmisión vectorial: Enfermedad de Chagas en el Gran Chaco. En: La enfermedad de Chagas. A la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. Balance y futuro, 1909-2006. Chagas, hacia el Siglo XXI. Silveira AC, editor. Organización Panamericana de la Salud, Fundación Mundo Sano.
- Gürtler, R.E., Cecere, M.C., Lauricella, M.A., Cardinal, M.V., Kitron, U., Cohen, J.E., 2007a. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 134, 69-82.
- Gürtler R.E., Kitron U., Cecere M.C., Segura E.L., Cohen, J.E., 2007b. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 104, 16194-16199.
- Herrera, H.M., Rademaker, V., Abreu, U.G.P, D'Andrea, P.S, Jansen, A.M, 2007. Variables that modulate the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Acta Trop.* 102, 55-62.
- Hide G, Tait A, 2004. Genetics and molecular epidemiology of trypanosomes. En: The Trypanosomiasis. Maudlin I, Holmes PH y Miles MA, ed. CABI Publishing, Oxfordshire, UK, pp 77-93.
- Higo, H., Miura, S., Horio, M., Mimori, T., Hamano, S., Agatsuma, T., Yanagi, T., Cruz-Reyes, A., Uyema, N., Rojas de Arias, A., Matta, V., Akahane, H., Hirayama, K., Takeuchi, T., Tada, I., Himeno, K., 2004. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitol. Int.* 53, 337-344.
- Hoff, R., Mott, K.E., Franca Silva, J., Menezes, V., Hoff, J.N., Barret, T.V., Sherlock, I., 1979. Prevalence of parasitemia and seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural population of northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 28: 461-466.
- Hoff, R., Todd, C.W., Maguire, J.H., Piesman, J., Mott, K.E., Mota, E.E., Sleigh, A., Sherlock, I.A., Weller, T.H., 1985. Serologic surveillance of Chagas disease. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 65 (Suppl. 1), S187-S196.
- Kahn, H.A., Stempos, C.T., 1989. *Statistical Methods in Epidemiology*, Monographs in Epidemiology and Biostatistics. New York: Oxford University Press. Pp. 292.
- Laferi, H., Kandel, K., Pichler, H., 1997. False positive dipstick test for malaria. *New Engl. J. Med.* 337, 1635-1636.

- Lauricella, M.A., Sinagra, A.J., Paulone, I., Riarte, A.R., Segura, E.L., 1989. Natural *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of endemic areas of the Argentine Republic. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 31, 63-70.
- Lauricella, M.A., Wisnivesky-Colli, C., Gürtler, R.E., Petersen, R.M., Bujas, M., Segura, E.L., 1993. Standardization of serological tests for detecting anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 8, 413-417.
- Lauricella, M.A., Castañera, M.B., Gürtler, R., Segura, E.L., 1998. Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas' Disease) Infection in Naturally Infected Dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93, 507-507.
- Lauricella, M.A., Stariolo, R.L., Riarte, A.R., Segura, E.L., Gürtler, R.E., 2005. Distribution and pathogenicity of *Trypanosoma cruzi* isolated from peridomestic populations of *Triatoma infestans* and *Triatoma guasayana* from rural western Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 123-129.
- Levy, M., Bowman, N., Kawai, V., Waller, L., Cornejo del Carpio, J., Cordova Benzaquen, E., Gilman, R., Bern, C., 2006. Periurban *Trypanosoma cruzi*-infected *Triatoma infestans*, Arequipa, Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1345-1352.
- Lukeš, J., Guilbride, D.L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., Englund, P.T., 2002., Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Eukariot. Cell* 1, 495-502.
- Luquetti, A.O., Rassi, A., 2000. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *En: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Brener, Andrade, Barral-Netto (Ed.). Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil. 2ª edición. Pp. 344-378.
- Luquetti, A., Ponce, Ponce, E., Esfandiari, J., Schijman, A., Revollo, S., Añez, N., Zingales, B., Ramgel-Aldao, R., Gonzalez, A., Levin, M., Umezawa, E., da Silveira, J., 2003. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas StatPak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46, 265-271.
- Macedo, A.M., Oliveira, R.P., Pena, S.D.J., 2002. Chagas Disease: role of parasitic genetic variation in pathogenesis. *Exp. Rev. Mol. Med.* 5 March, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/02004118h.htm>
- Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P., Pena, S.D.J., 2004. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 1-12.

- March D, Susser E, 2006. The eco- in Eco-epidemiology. *Int. J. of Epidemiol.* 35, 1379-1383.
- Marcet, P.L., Duffy, T., Cardinal, M.V., Burgos, J.M., Lauricella, M.A., Levin, M.J., Kitron, U., Gürtler, R.E., Schijman, A.G., 2006. PCR-based screening and typing of *Trypanosoma cruzi* lineages directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology* 132, 57-65.
- Marin-Neto, J.A., Simões, M.V., Lima Sarabanda, A.V., 2000. Forma crônica cardíaca. *En: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Brener, Andrade, Barral-Netto (Ed.). Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil. 2ª edición. Pp. 266-298.
- Marsden, P.D., 1997. The control of Latin American Trypanosomiasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30, 521-527.
- Mayer, H.F., Alcaraz, I., 1954. Investigaciones sobre Esquizotripanosis en perros y gatos de la zona suburbana de Resistencia. *An. Inst. Med. Reg.* 4, 9-17.
- Mazza, S., 1930. Acerca de la infección espontánea de la mulita por el *Trypanosoma cruzi* en el Norte Argentino. Comprobación en el miocardio y en el pulmón de los “gigantocitos quísticos” de Magarinos Torres. *La Prensa Médica Argentina* 17: 49-54.
- Mazza ,S., Schreiber F., 1938. Hallazgos en el Departamento de Obligado, Santa Fé, de otra especie de mustélido infectado con *Schizotrypanum cruzi*, de *Triatoma infestans* infectados en nidos de comadreja; de *Triatoma platensis* infectados en nidos de picitácidos y de *Psammolestes coreodes* sin infestación en nidos de dendrocoláptidos. *Misión de Estudios de Patología Regional Argentina*. Universidad de Buenos Aires 34, 17-35.
- Médicos Sin Fronteras, 2005. Chagas, una tragedia silenciosa. Editorial Losada, Buenos Aires, Argentina, 111 pág.
- Miles, M.A., Toye, P.J., Oswald, S.C., Godfrey, D.G., 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 217-225.
- Miles MA, Souza AA, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ., 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-821.

- Miles, M.A., Yeo, M., Gaunt, M., 2003. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the Epidemiology of Chagas Disease. *En: Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of Chagas Disease*. Kelly, J.M. (Ed.). Eureka.com & Kluwer Academic/ Plenum Publishers. Pp. 1-15.
- Minter, D.M., 1976. Effects on transmission to man of the presence of domestic animals in infested households, In: Pan American Health Organization, New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Washington DC, Scientific Publication No. 318, 330-337.
- Montamat, E.E., Arauzo, S., Cazzulo, J.J., Subias, E., 1987. Characterization by electrophoretic zymograms of 19 *Trypanosoma cruzi* clones derived from two chronic chagasic patients. *Comp. Biochem. Physiol.* 87, 417-422.
- Montamat, E.E., De Luca d'Oro, G., Perret, B., Rivas, C., 1992. Characterization of *Trypanosoma cruzi* from Argentina by electrophoretic zymograms. *Acta Trop.* 50, 125-133.
- Montamat, E.E., De Luca d'Oro, G.M., Gallerano, R.H., Sosa, R., Blanco, A., 1996. Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical picture. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 625-628.
- Montenegro, V., Jiménez, M., Pinto Dias, J., Zeledón, R., 2002. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 491-494.
- Moretti ER, Basso B, Albesa I, Eraso AJ, Kravetz FO, 1980. Infección natural de *Calomys laucha* por *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Bs As)*, 40 (Supl 1), 181-186.
- Mott, K.E., Lehman, J.S. Jr, Hoff, R., Morrow, R.H., Muniz, T.M., Sherlock, I., Draper, C.C., Pugliese, C., Guimaraes, A.C., 1976. The epidemiology and household distribution of seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25, 552-562.
- Mott, K.E., Mota, E.A., Sherlock, I., Hoff, R., Muniz, T.M., Oliveira, T.s., Draper, C.C., 1978. *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and cats and household seroreactivity to *T. cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Hyg.* 27, 1123-1127.
- Muench, H., 1959. *Catalytic Models in Epidemiology*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. Pp.110.

- Nájera, L., Mayer, H.F., Nájera, J.A., 1950. Índice de infestación por *Schizotrypanum cruzi* de perros y gatos de la zona periurbana de Resistencia. Reunión Cient. S.A.P.E.T. (Distrito Perón).
- Noireau, F., Flores, R., Gutierrez, T., Abad-Franch, F., Flores, E., Vargas, F., 2000. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94, 23-27.
- Oelemann, W.M., Teixeira, M.D., Veríssimo Da Costa, G.C., Borges-Pereira, J., De Castro, J.A., Coura, J.R., Peralta, J.M., 1998. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. J. Clin. Microbiol. 36, 2423-2427.
- Petersen, R.M., Gürtler, R.E., Cecere, M.C., Rubel, D.N, Hansen, D., Lauricella, M.A. and Carlomagno, M., 2001. Association between nutritional indicators of dogs seroreactive for *Trypanosoma cruzi* in a rural area of northwestern Argentina. Parasitol. Res. 87, 208-214.
- Pinho Ribeiro, A.L., da Costa Rocha, M.O., 2000. Forma indeterminada da Doença de Chagas. En: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Brener, Andrade, Barral-Netto (Ed.). Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil. 2ª edición. Pp. 246-265.
- Pinto, C.F., 1942. Tripanosomiasis cruzi (Doença de Carlos Chagas) no Rio Grande do Sul, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 37, 443-537.
- Pinto Dias, J.C., 2000. Epidemiologia. En: Brener, Z., Andrade, Z.A., Barral-Netto, M. (Ed.). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, second ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 48-74.
- Pinto Dias, J.C., Silveira, A.C., Schofield, C.J., 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 603-612.
- Ponce, C., Ponce, E., Vinelli, E., Montoya, A., de Aguilar, V., Gonzalez, A., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Levin, M.J., Esfandiari, J., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O., da Silveira, J.F., 2005. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' disease by detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. J Clin. Microbiol. 43, 5065-5068.
- Portela-Lindoso, A.A., Shikanai-Yasuda, M.A., 2003. Chronic Chagas's disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. Cad. Saude Pública 37, 107-115.

- Prata, A., 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 1, 92-100.
- Profeta Luz, Z.M., 1999. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 295-298.
- Rassi, A., Rassi, A.Jr., Rassi, G.G., 2000. Fase Aguda. *En: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.* Brener, Andrade, Barral-Netto (Ed.). Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil. 2ª edición. Pp. 231-245.
- Reithinger, R., Quinnell, R.J., Alexander, B., Davies, C.R., 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2352-2356.
- Reithinger, R., Ceballos, L.A., Stariolo, R., Davies C.R., Gürtler R.E., 2006. Extinction of experimental *Triatoma infestans* populations following continuous exposure to dogs wearing deltamethrin-treated collars. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 766-771.
- Requena, J.M., López, M.C., Alonso, C., 1996. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* 12, 279-283.
- Roddy, P., Goiri, J., Flevaud, L., Palma, P.P., Morote, S., Lima, N., Villa, L., Torrico, F., Albajar-Viñas, P., 2008. Field evaluation of a rapid immunochromatographic assay for detection of *Trypanosoma cruzi* infection by use of whole blood. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2022-2027.
- Rozas, M., Botto-Mahan, C., Coronado, X., Ortiz, S., Cattán, P.E., Solari, A., 2007. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 647-653.
- Schenone, H., Contreras, M.C., Borgoño, J.M., Maturana, R., Salinas, P., Sandoval, L., Rojas, A., Tello, P., Villarroel, F., 1991. Overview of the epidemiology of Chagas' disease in Chile. *Bol Chil Parasitol.* 46, 19-30.
- Schijman, A.G., Altcheh, J., Burgos, J.M., Biancardi, M., Bisio M., Levin, M., Freilij, H., 2003. Aetiological treatment of Congenital Chagas disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 441-449.
- Schijman, A.G., Lauricella, M.A., Marcet, P.L., Duffy, T., Cardinal, M.V., Bisio, M., Levin, M.J., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2006. Differential detection of *Blastocrithidia triatomae* and *Trypanosoma cruzi* by amplification of 24s

ribosomal RNA genes in faeces of sylvatic triatomine species from rural northwestern Argentina. *Acta Trop.* 99, 50-54.

- Schmuñis, G.S., 2000. A Tripanossomíase Americana e seu impacto na saúde pública das Américas. *En: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.* Brener, Andrade, Barral-Netto (Ed.). Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil. 2ª edición. Pp. 1-15.
- Schofield, C.F., Jannin, J., Salvatella, R., 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22, 583-588.
- Schweigmann, N.J., Alberti, A., Pietrokovsky, S., Conti, O., Riarte, A., Montoya, S., Wisnivesky-Colli, C., 1992. A new host of *Trypanosoma cruzi* from Jujuy, Argentina: *Octodontomys gliroides* (Gervais & D'Orbigny, 1844) (Rodentia, Octodontidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87, 217-220.
- Schweigmann, N.J., Pietrokovsky, S., Bottazi, V., Conti, O., Bujas, M., Wisnivesky-Colli, C., 1999. Estudio de la prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* en zarigüeyas (*Didelphis albiventris*) en Santiago del Estero, Argentina. *Rev. Panam. Salud Publica* 6, 371-377.
- Segura, E.L., Cura, E.N., Sosa Estani, S., Andrade, J., Lansetti, J.C., de Rissio, A.M., Campanini, A., Blanco, S.B., Gürtler, R.E., Alvarez, M., 2000. Long-term effects of a nationwide control program on the seropositivity for *Trypanosoma cruzi* infection in young men from Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 353-362.
- Segura, E.L., 2002. El control de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. *En: El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una iniciativa internacional 1991/2001* Silveira AC (Ed.). PAHO, Argentina. Pp. 45-108.
- Sherlock, I.A., 2000. Vetores. *En: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.* Brener, Andrade, Barral-Netto (Ed.). Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil. 2ª edición. Pp. 21-40.
- Sherlock, I.A., Carcavallo, R.U., Galíndez Girón, I., 1998. List of natural and experimental flagellate infections in several triatomine species. *En: Atlas of Chagas Disease vectors in the Americas.* Carcavallo, Galíndez Girón, Jurgerg, Lent (Ed.). Editora Fiocruz Rio de Janeiro, Brasil. Vol I pp. 289-298.
- Steindel, M., Kramer Pacheco, P., Scholl, D., Soares, M., Hoehr de Moraes, M., Eger, I., Kosmann, C., Marques Sincero, T.C., Hermes Stoco, P., Fonseca Murta, S.M., de Carvalho-Pinto C.J., Grisard, E.C., 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi*

isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 25-32.

Stevens JR, Brisse S, 2004. Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance. *En: The Trypanosomiasis*. Maudlin I, Holmes PH y Miles MA (Ed.). CABI Publishing, Oxfordshire, UK. Pp 1-24.

Storino y Milei, 1994. Introducción. *En: Enfermedad de Chagas*. Storino R y Milei J, ed. Mosby, Doyma Argentina, Buenos Aires.

Susser, M y Susser, E, 1996. "Choosing a future for epidemiology: I. Eras and paradigms". *Am J Public Health* 86: 668-673.

Talice, R.V., Osimani, J.J., 1965. Primeros mamíferos domésticos infectados por el *T. cruzi* comprobados en Fray Bentos. *An Fac Med Montevideo*, 805-810.

Telleria, J., Lafay, B., Virreira, M., Barnabé, C., Tibayrenc, M., Svoboda, M., 2006. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp. Parasitol.* 45, 221-229.

Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., Ayala, F., 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 115-119.

Tibayrenc, M., 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 2, 12.

Vazquez-Prokopec , G.M., 2007. Efectos de las acciones de control vectorial sobre la infestación por *Triatoma infestans* a múltiples escalas espaciales y temporales en comunidades rurales del chaco argentino. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina, pp. 199.

Vazquez-Prokopec, G.M., Ceballos, L.A., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2004. Active Dispersal of Natural Populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Rural Northwestern Argentina. *J. Med. Entomol.* 41, 614-621.

Vazquez-Prokopec, G.M., Ceballos, L.A., Marcet, P.L., Cecere, M.C., Cardinal, M.V., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2006. Seasonal variations in active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* in rural north-western Argentina. *Med. Vet. Entomol.* 20, 273-279.

- Vexenat, A., Santana, J., Teixeira, A., 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 38, 177-185.
- World Health Organization, 2002. *Control of Chagas disease*, WHO Technical Report Series 905. World Health Organization, Geneva, pp. 82-83.
- World Health Organization. 2004. World Health Report: Changing History. World Health Organization, Geneva, pp 1-96.
- World Health Organization. 2007. World Health Report: A safer future. Global Public Health Security in the 21st Century. World Health Organization, Geneva, pp 1-96.
- Williams-Blangero, S., Vandenberg, J.L., Blangero, J., Teixeira, A.R., 1997. Genetic epidemiology of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* infection in rural Goias, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57, 538-543.
- Wisnivesky-Colli, C., Gürtler, R.E., Solarz, N.D., Lauricella, M.A., Segura, E.L., 1985. Epidemiological role of humans, dogs and cats in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a central area of Argentina. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 27, 346-352.
- Wisnivesky - Colli, C., 1987. Feeding patterns of Triatominae in relation to transmission of American Trypanosomiasis. *En: Chagas' Disease Vectors*. Brenner y Stoka (ed.). Vol. 1, pp. 99-117.
- Wisnivesky-Colli, C., Schweigmann, N.J., Alberti, A., Pietrokovsky, S.M., Conti, O., Montoya, S., Riarte, A., Rivas, C., 1992. Sylvatic American trypanosomiasis in Argentina. *Trypanosoma cruzi* infection in mammals from the Chaco forest in Santiago del Estero. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 86, 38-41.
- Wongsrichanalai, C., 2001. Rapid diagnostic techniques for malaria control. Parasitol. Today 17:307-309.
- Woolhouse, M.E.J., Dye, C., Etard, J.F., Smith, T., Charlwood, J.D., Garnett, G.P., Hagan, P., Hii, J.L.K., Ndhlovu, P.D., Quinell, R.J., Watts, C.H., Chandiwana, S.K., Anderson, R.M., 1997. Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 94, 338-342.
- Yadón, Z.E., Quigley, M.A., Davies, C.R., Rodrigues, L.C., Segura, E.L., 2001. Assessment of leishmaniasis notification system in Santiago del Estero, Argentina, 1990-1993. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65, 27-30.

- Yeo, M., Acosta, M., Llewellyn, M., Sánchez, H., Adamson, S., Miles, G., López, E., González, N., Patterson, J., Gaunt, M., Rojas de Arias, A., Miles, M.A., 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.* 35, 225-233.
- Yeo, M., Lewis, M.D., Carrasco H.J., Acosta, M., Llewellyn, M., da Silva Valente, S.A., de Costa Valente, V., Rojas de Arias, A., Miles, M.A., 2007. Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *Int. J. Parasitol.* 37, 111-112.
- Zaidemberg, M., Spillmann, C., Carriso Páez, R., 2004. Control de Chagas en la Argentina. Su evolución. *Revista Argentina de Cardiología* 72, 375-380.
- Zeledón, R., 1974. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. *En: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas Disease, CIBA Foundation Symposium 20 (new series), pp. 51-77.*

Anexo 1: Encuestas realizada a los pobladores

Encuesta de animales domésticos:

Localidad _____ Casa N° _____ Jefe de familia _____

¿Tiene animales domésticos? SI NO

N° perros _____ N° gatos _____

ENCUESTA PERROS RÓTULO _____

Nombre del perro: _____

Sexo M F

Edad _____ meses _____ años

Contextura: 1. Grande 2. Mediana 3. Pequeña

Pelaje: 1. Corto 2. Largo COLOR: _____

Señas: _____

Estado general del animal: BUENO REGULAR MALO

Peso _____ Talla _____

¿El perro fue vacunado alguna vez? SI NO

¿Consultaron alguna vez al veterinario? SI NO

¿Viajó a otras localidades desde que nació? SI NO

¿Dónde y cuánto tiempo estuvo? _____

Nació en: 1. La casa 2. Amamá (otra casa) 3. Trinidad 4. Mercedes
5. Otros _____ 6. No sabe

Función del perro: 1. Guardián 2. Cazador 3. Cabrero

Se alimenta de: 1. Zapallo, verduras, restos, polenta, otros 2. Carne cocida
3. Carne cruda 4. Presas de caza 5. No sabe

¿Come el perro vísceras de mamíferos crudos? SI NO

¿Come el perro vinchucas? SI NO

¿El perro lame las paredes? SI NO

¿Dónde duerme?

En invierno: 1. Dormitorios 2. Galería 3. Corrales
4. Depósitos 5. Otro lugar 6. No sabe

En verano: 1. Dormitorios 2. Galería 3. Corrales
4. Depósitos 5. Otro lugar 6. No sabe

Nombre de la madre del perro _____ Vive: SI NO

¿Dónde vive la madre? 1. Casa _____ 2. Otros _____

Sólo para HEMBRAS:

¿Está castrada? SI NO

¿Tuvo cría alguna vez? SI NO

¿Cuándo fue la última vez que tuvo cría? _____

¿Cuántos cachorros vivos nacieron? _____

¿Tiene actualmente cachorros vivos? SI NO

Nombres _____ Edad _____ Vive en _____

Nombres _____ Edad _____ Vive en _____

Nombres _____ Edad _____ Vive en _____

Nombres _____ Edad _____ Vive en _____

Nombres _____ Edad _____ Vive en _____

ENCUESTA GATOS

RÓTULO_____

Nombre del gato:_____

Sexo M F

Edad _____meses _____años

Contextura: 1. Grande 2. Mediana 3. Pequeña

Pelaje: 1. Corto 2. Largo COLOR:_____

Señas: _____

Estado general del animal: BUENO REGULAR MALO

¿El gato fue vacunado alguna vez? SI NO

¿Consultaron alguna vez al veterinario? SI NO

¿Viajó a otras localidades desde que nació? SI NO

¿Dónde y cuánto tiempo estuvo? _____

Nació en: 1. La casa 2. Amamá (otra casa) 3. Trinidad 4. Mercedes
5. Otros _____ 6. No sabe

Función del gato: 1. Guardián 2. Cazar los ratones 3. Otras _____

Se alimenta de: 1. Zapallo, verduras, restos, polenta, otros 2. Carne cocida
3. Carne cruda 4. Presas de caza 5. No sabe

¿Desaparece en el monte? SI NO

¿Cuánto tiempo? _____

¿Caza animales silvestres? SI NO

¿Cuáles? _____

¿Dónde duerme?

En invierno: 1. Dormitorios 2. Galería 3. Corrales
4. Depósitos 5. Otro lugar 6. No sabeEn verano: 1. Dormitorios 2. Galería 3. Corrales
4. Depósitos 5. Otro lugar 6. No sabe

Nombre de la madre del gato _____ Vive: SI NO

¿Dónde vive la madre? 1. Casa _____ 2. Otros _____

Sólo para HEMBRAS:

¿Está castrada? SI NO

¿Tuvo cría alguna vez? SI NO

¿Cuándo fue la última vez que tuvo cría? _____

¿Cuántos cachorros vivos nacieron? _____

¿Tiene actualmente cachorros vivos? SI NO

Nombres _____ Edad _____ Vive en _____

Nombres _____ Edad _____ Vive en _____

Nombres _____ Edad _____ Vive en _____

Nombres _____ Edad _____ Vive en _____

Nombres _____ Edad _____ Vive en _____